

**LEANDRO CARDOSO RIBEIRO**

**ANÁLISE GENÔMICA DE *Serratia liquefaciens* ISOLADA DE LEITE E INIBIÇÃO  
DA PROTEÓLISE E LIPÓLISE POR NISINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti

Coorientadora: Denise Mara Soares Bazzolli

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R484a  
2023  
Ribeiro, Leandro Cardoso, 1986-  
Análise genômica de *Serratia liquefaciens* isolada de leite e  
inibição de proteólise e lipólise por nisina / Leandro Cardoso  
Ribeiro. – Viçosa, MG, 2023.  
1 tese eletrônica (86 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.547>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leite - Microbiologia. 2. *Serratia liquefaciens*.  
3. Bactérias gram-negativas. 4. Nisina. 5. Proteólise. 6. Lipólise.  
7. Genômica. I. Vanetti, Maria Cristina Dantas, 1957-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 636.1277


**LEANDRO CARDOSO RIBEIRO**

**ANÁLISE GENÔMICA DE *Serratia liquefaciens* ISOLADA DE LEITE E INIBIÇÃO  
DA PROTEÓLISE E LIPÓLISE POR NISINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 12 de maio de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 LEANDRO CARDOSO RIBEIRO  
Data: 05/10/2023 09:02:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Leandro Cardoso Ribeiro  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 MARIA CRISTINA DANTAS VANETTI  
Data: 04/10/2023 22:12:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Maria Cristina Dantas Vanetti  
Orientadora

Dedico este trabalho à minha querida  
mãe, Maria, cujo amor incondicional e  
incentivo constante me permitiram  
alcançar este marco em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo ensino de excelência, estrutura que forneceram as condições necessárias para meu desenvolvimento intelectual e profissional. estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelo profissionalismo, pela orientação, ensinamentos, paciência e pelas palavras que me fizeram refletir e evoluir como pessoa e como profissional.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, por toda disposição em me ajudar, me ouvir e por todo carinho e incentivo.

À professora Míriam Teresinha dos Santos, pela amizade, pela força, por estar comigo em tantos momentos e pelas contribuições.

À professora Solimar Gonçalves Machado, pelo isolamento das bactérias utilizadas neste estudo, pelo carinho e doçura, disponibilidade e pelas contribuições.

Ao Professor Natal de Jesus Pimentel Filho pelas contribuições e disponibilidade em, mais uma vez, compartilhar de um momento tão importante em minha formação.

Ao João Batista Ribeiro, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, por gentilmente aceitar participar desta ocasião e por suas valiosas contribuições.

À professora Marisa Vieira de Queiroz por sempre me receber tão bem e pelo apoio para a execução dos meus experimentos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia que desempenharam um papel fundamental na minha formação e no desenvolvimento do meu conhecimento.

À minha mãe, Maria, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e pela dedicação e esforço para tornar possível minha formação.

À minha irmã, Fernanda, por todo amor, carinho e por toda alegria nos momentos de encontro.

Ao João Lucas por sempre me apoiar, incentivar e acreditar que eu era capaz, sendo meu suporte em muitos momentos difíceis.

Ao Jobim, por tornar essa jornada mais leve e sempre me oferecer carinho e momentos divertidos de descontração.

Ao Thiago e à Bianca, meus irmãos de coração, por todo afeto, amparo e pela amizade que foi fundamental para que eu chegasse até o final.

À Cleonice, pela amizade sincera, pelas discussões acadêmicas valiosas, pela contribuição nos experimentos e pela força e pelos momentos de descontração que ficarão para sempre minha memória.

À querida amiga Mísia, pela amizade e por todas as palavras de apoio e carinho.

À Camila, do Laboratório de Associações Micorrízicas, por todo o carinho e por compartilhar tantos momentos divertidos comigo. Seu companheirismo tornou meus dias mais alegres e memoráveis.

Ao Pedro Marcus Pereira Vidigal pela paciência em me ensinar e pelo apoio em bioinformática.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes e à Dra. Ananda Pereira Aguiar pela disponibilidade e por toda ajuda com os experimentos.

À professora Poliane Alfenas por sua contribuição com o sequenciamento do genoma, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, Leonardo, Gabriel, Deisy, Marcos e Cleonice, pelo apoio e convivência agradável e por sempre estarem dispostos a ajudar, discutir os resultados e compartilhar conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia da UFV e do BIOAGRO pela amizade, atenção e serviços prestados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Leandro Cardoso Ribeiro, filho de Maria da Penha Cardoso e Sebastião Marcos Ribeiro, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em julho de 2010, graduou-se em Biomedicina pela Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em julho de 2018, obteve o título de Mestre em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

Em agosto de 2018, ingressou no doutorado em Microbiologia Agrícola na mesma instituição.

## RESUMO

CARDOSO, Leandro Cardoso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2023. **Análise genômica de *Serratia liquefaciens* isolada de amostra de leite e inibição da proteólise e lipólise por nisina.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadora: Denise Mara Soares Bazzoli.

*Serratia* é um gênero de bactérias Gram-negativas que pode ser encontrado em diversos ambientes como solo, água, plantas, animais e humanos. Algumas espécies são relatadas como contaminantes de alimentos, sendo associadas à deterioração de produtos alimentícios, resultando em prejuízos econômicos e ambientais devido ao desperdício. A espécie *S. liquefaciens* é frequentemente mencionada como deterioradora de alimentos refrigerados, como frutos do mar, queijos e leite cru. É considerada um problema para a indústria de alimentos devido à síntese de enzimas extracelulares termorresistentes, como proteases e lipases, que permanecem ativas mesmo após o processamento térmico. Estudos prévios mostraram o efeito inibidor da bacteriocina nisina sobre a atividade de proteases e lipases de *S. liquefaciens*. Nisina é um peptídeo catiônico com amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, e seu uso como conservante de alimentos é permitido desde 1950. Este trabalho objetivou investigar as características moleculares de *S. liquefaciens* L211 isolada de leite, por meio de análises genômicas utilizando ferramentas de bioinformática e avaliar o efeito da nisina nas atividades proteolítica e lipolítica da bactéria em questão. Para isso, foi realizado o sequenciamento do genoma de *S. liquefaciens* L211 utilizando a plataforma MinION. Em seguida a montagem e anotação do genoma foram realizadas, destacando as características funcionais dos genes da bactéria. Foram realizadas análises comparativas do genoma do isolado L211 com outros genomas *S. liquefaciens*, completos e anotados, disponíveis no banco de dados do NCBI. Análises fenotípicas evidenciaram que o *S. liquefaciens* L211 possui a capacidade de se locomover, utilizando as motilidades do tipo *swarming*, *swimming* e *twitching*. Além disso, foi constatada a capacidade de síntese de sideróforos, proteases e poliuretase com atividade de lipase no isolado. As atividades proteolítica e lipolítica de *S. liquefaciens* L211 foram avaliadas e quantificadas em leite desnatado reconstituído à 10% (p/v) com e sem a adição de nisina (400 UA/mL) para verificar o efeito inibitório de nisina sobre a atividade enzimática. Posteriormente, foi avaliado se a inibição da atividade enzimática por nisina é decorrente da diminuição da expressão dos genes *ser1*, *ser2* e *lipA* relacionados com a síntese das proteases e lipase de *S. liquefaciens*. As análises do genoma de *S. liquefaciens* L211 revelaram que a espécie apresenta características genéticas preservadas, ao passo que as variações entre os indivíduos da espécie

*S. liquefaciens* possibilitam sua adaptação a diferentes ambientes. Além disso, também foi observado que *S. liquefaciens* possui genes que codificam enzimas associadas à deterioração de alimentos. Foi demonstrado que, apesar de não ter atividade bactericida contra *S. liquefaciens*, a concentração 400 UA/mL de nisina inibe a atividade proteolítica e lipolítica. Não foram encontradas referências na literatura que relatem a inibição das atividades enzimáticas por nisina em *S. liquefaciens*. Nisina inibiu a transcrição de genes de proteases e lipase de *S. liquefaciens* L211 e o mecanismo de regulação envolvido ainda precisa ser elucidado. Este trabalho destaca a versatilidade do repertório genético de *S. liquefaciens*, a relevância da bactéria como deterioradora de alimentos e revela o potencial inibitório de nisina sobre a atividade enzimática.

Palavras-chave: Tese. Pós-graduação. Leite. Microbiologia. *Serratia liquefaciens*. Bactérias Gram-negativas. Nisina. Proteólise. Lipólise. Genômica.

## ABSTRACT

CARDOSO, Leandro Cardoso, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2023. **Genomic analysis of *Serratia liquefaciens* isolated from milk sample and inhibition of proteolysis and lipolysis by nisin.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-adviser: Denise Mara Soares Bazzolli.

*Serratia* is a genus of Gram-negative bacteria that can be found in various environments such as soil, water, plants, animals, and humans. Some species are reported as food contaminants, being associated with the deterioration of food products, resulting in economic and environmental damage due to waste. The species *S. liquefaciens* is often mentioned as a food spoilage organism for refrigerated foods such as seafood, cheese, and raw milk. It is considered a problem for the food industry due to the synthesis of extracellular thermostable enzymes, such as proteases and lipases, which remain active even after thermal processing. Previous studies have shown the inhibitory effect of the bacteriocin nisin on the proteolytic and lipolytic activities of *S. liquefaciens*. Nisin is a cationic peptide with a broad spectrum of action against Gram-positive bacteria, and its use as a food preservative has been allowed since 1950. This work aimed to investigate the molecular characteristics of *S. liquefaciens* L211 isolated from milk, through genomic analyzes using bioinformatics tools and to evaluate the effect of nisin on the proteolytic and lipolytic activities of the bacterium in question. For this purpose, the genome of *S. liquefaciens* L211 was sequenced using the MinION platform. Then, genome assembly and annotation were performed, highlighting the functional characteristics of the bacterium's genes. Comparative genome analyses of the L211 isolate with other complete and annotated *S. liquefaciens* genomes available in the NCBI database were performed. Phenotypic analyzes showed that *S. liquefaciens* L211 has the ability to move, using swarming, swimming and twitching motilities. In addition, the ability to synthesize siderophores, proteases and polyuretanase with lipase activity in the isolate was verified. The proteolytic and lipolytic activities of *S. liquefaciens* L211 were evaluated and quantified in 10% (w/v) reconstituted skim milk with and without the addition of nisin (400 UA/mL) to verify the inhibitory effect of nisin on the enzymatic activity. Then, it was evaluated whether the inhibition of *S. liquefaciens* enzymatic activity by nisin is due to the decreased expression of the *ser1*, *ser2*, and *lipA* genes related to the synthesis of these enzymes. Genomic analyses of *S. liquefaciens* L211 showed that the species had conserved genetic characteristics, and differences among the members allow them to be found in different habitats. Additionally, it was also observed that *S. liquefaciens* has genes encoding enzymes associated with food spoilage. It was demonstrated

that, although it does not have bactericidal activity against *S. liquefaciens*, 400 UA/mL of nisin inhibits proteolytic and lipolytic activity. There were no reports in the literature about this effect. Nisin inhibited the transcription of protease and lipase genes of *S. liquefaciens* L211, and the regulatory mechanism involved still needs to be elucidated. This work highlights the versatility of the genetic repertoire of *S. liquefaciens*, the relevance of the bacterium as a food spoilage organism, and reveals the inhibitory potential of nisin on enzymatic activity.

Keywords: Thesis. Milk. Microbiology. *Serratia liquefaciens*. Gram-negative bacteria. Nisin. Proteolysis. Lipolysis. Genomics

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução geral .....	14
2. Referências bibliográficas .....	19

### CAPÍTULO 1 - Sequenciamento e análise do genoma de *Serratia liquefaciens* isolada de amostra de leite.

1.Introdução .....	26
2.Materiais e métodos.....	28
2.1. Bactéria usada e condições de cultivo .....	28
2.2. Extração do DNA .....	28
2.3. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma .....	28
2.4. Análise da inserção de profagos .....	29
2.5. Identificação de ilhas genômicas .....	29
2.6. Predição de <i>cluster</i> de genes biossintéticos (BGCs).....	30
2.7. Alinhamento e análise comparativa do genoma .....	30
2.8. Cálculo da Identidade Média de Nucleotídeos (ANI – <i>Average Nucleotide Identity</i> ) e análise filogenética .....	31
2.9. Avaliação de características fenotípicas de <i>S. liquefaciens</i> L211.....	32
2.9.1. Motilidade.....	32
2.9.2. Produção de sideróforos.....	32
2.9.3. Atividades enzimáticas .....	33
3. Resultados.....	34
3.1 Características gerais do genoma de <i>S. liquefaciens</i> L211 .....	34
3.2 Análises de genômica comparativa .....	38
3.3 Análise filogenética .....	42
3.4 Características fenotípicas de <i>S. liquefaciens</i> L211.....	44
3.4.1. Motilidade.....	44

3.4. 2. Produção de sideróforos .....	45
3.4.3. Atividade enzimática .....	46
4. Discussão .....	47
5. Conclusão .....	52
6. Referências bibliográficas .....	53

**CAPÍTULO 2 - Inibição das atividades proteolítica e lipolítica de *Serratia liquefaciens* por nisina.**

1. Introdução .....	63
2. Material e métodos .....	66
2.1. Isolado bacteriano .....	66
2.2. Preparo e atividade da solução estoque de nisina .....	66
2.3. Condições de cultivo.....	66
2.4. Quantificação da atividade proteolítica .....	67
2.5. Quantificação da atividade lipolítica .....	67
2.6. Avaliação das atividades proteolítica e lipolítica em ágar.....	68
2.7. Extração e quantificação de RNA.....	68
2.8. Purificação do RNA e síntese de cDNA.....	69
2.9. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) .....	69
2.10. Análises estatísticas .....	70
3. Resultados.....	71
4. Discussão .....	76
5. Conclusão .....	79
6. Referências bibliográficas .....	80

## **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. Introdução geral

A deterioração microbiana de alimentos é um processo que leva a alterações indesejáveis nas características dos produtos, tornando-os impróprios para o consumo e resultando em significativas perdas econômicas para produtores, empresas e consumidores (ODEYEMI et al., 2020; SNYDER; WOROBO, 2018). Por isso, são necessárias estratégias de controle dos microrganismos para garantir a conservação e qualidade dos alimentos. O uso de conservantes, variações de pH, emprego de calor e baixas temperaturas são alguns dos fatores usados em processos de conservação para inibir ou eliminar os microrganismos nos alimentos (BEALES, 2004).

A refrigeração é um dos métodos de conservação de alimentos mais utilizados para prolongar a vida de prateleira (MARCOS et al., 2023). A prática de refrigerar os alimentos inibe ou retarda o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a deterioração de alimentos. Entretanto, alguns microrganismos têm a capacidade de se desenvolver e multiplicar em baixas temperaturas e estão classificados como psicrófilos e psicrotróficos. Psicrotróficos são microrganismos que, embora apresentem temperaturas ótimas de crescimento mais elevadas, crescem em temperaturas de refrigeração e podem ser encontrados em alimentos refrigerados como carne bovina (WICKRAMASINGHE et al., 2021), carne de frango (SAMAPUNDO et al., 2019), frutos do mar (HE et al., 2022; STERNIŠA et al., 2020) e produtos lácteos (HAHNE et al., 2019; YANG et al., 2020).

*Serratia* é um gênero de bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonete, que pertence à classe Gammaproteobacteria e a ordem *Enterobacteriales* (ADEOLU et al., 2016). Algumas espécies de *Serratia* são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração e comumente são associadas à deterioração de alimentos refrigerados, levando a perda de produtos alimentícios e prejuízos econômicos e ambientais (BEGREM et al., 2021a). As espécies *Serratia proteamaculans*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia quinivorans* e *Serratia liquefaciens* foram isoladas de carnes bovinas, suínas e aves comercializadas em embalagens com atmosfera modificada (SÄDE; MURROS; BJÖRKROTH, 2013). Dib et al. (2018) detectaram *Serratia marcescens* e *Serratia odorifera* em sardinhas e camarões comercializados em diferentes peixarias no nordeste da Argélia. *S. liquefaciens* foi detectada como deterioradora em diferentes tipos de alimentos como produtos lácteos (MACHADO et al., 2015; MARTELLI et al., 2020), embutidos (HOSPITAL et al., 2017), frutos do mar (BEGREM et al., 2021a), vegetais (STEIN et al., 2020), entre outros.

Devido a sua versatilidade metabólica, *S. liquefaciens* é capaz de crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio e em ambientes hipobáricos (BEGREM et al., 2021a). Juntamente com *Proteus vulgaris*, *S. liquefaciens* foi relatada como principal responsável pela deterioração de presunto curado, ocasionando em estufamento do produto devido a produção de gás e mal cheiro devido a atividade proteolítica (HOSPITAL et al., 2017; LOSANTOS et al., 2000). Análises de carnes bovina, suína, de frango e de peru, refrigeradas e embaladas em atmosfera modificada enriquecida com CO<sub>2</sub>, identificaram *S. liquefaciens* como uma das principais bactérias contaminantes que podem levar a deterioração dos produtos (SÄDE; MURROS; BJÖRKROTH, 2013). Machado et al. (2015) detectaram *S. liquefaciens* e *Pseudomonas* spp. como as principais espécies bacterianas proteolíticas deterioradoras de leite cru refrigerado. Yuan et al. (2017) também detectaram *S. liquefaciens* como um dos principais psicrotróficos contaminantes de leite cru. Martelli et al. (2020) isolaram 10 estirpes de *S. liquefaciens* de áreas com o defeito de descoloração rosa em queijo pecorino. Begrem et al. (2021) demonstraram a predominância de *S. liquefaciens* e *S. proteamaculans* como contaminantes de salmão, atum e camarão. Estes estudos mostram o potencial de *S. liquefaciens* de colonizar diferentes tipos de alimentos e reforçam a importância de conhecer a espécie, buscando entender seu papel como deterioradora de produtos alimentícios.

A deterioração de alimentos por bactérias psicrotróficas, como *S. liquefaciens*, está associada, principalmente, à capacidade de secretar enzimas hidrolíticas. Proteases e lipases são exemplos de enzimas hidrolíticas que clivam, respectivamente, as proteínas e triglicerídeos presentes nos alimentos, resultando em alterações indesejáveis nas propriedades sensoriais, como sabor amargo, odor desagradável, rancidez, entre outros. Por serem termorresistentes, estas enzimas são um grande problema, principalmente para a indústria de laticínios. Bactérias psicrotróficas sintetizam proteases e lipases durante o transporte e armazenamento do leite sob temperatura de refrigeração, e a atividade hidrolítica persiste após o tratamento térmico aplicado durante a fabricação de diversos produtos lácteos (MACHADO et al., 2017).

*S. liquefaciens* é capaz de produzir duas metaloproteases, codificadas pelos genes *ser1* e *ser2*, com massa molecular de, aproximadamente, 50 kDa (KAIBARA et al., 2012; MACHADO et al., 2016). Entretanto, foi demonstrado que apenas a protease Ser2 apresenta termorresistência (MACHADO et al. 2016). Salgado et al. (2021) purificaram e identificaram a lipase termorresistente sintetizada por *S. liquefaciens* isolada de amostras de leite cru e os resultados demonstraram que a enzima é uma poliuretânase com atividade de lipase, tendo afinidade por diferentes ácidos graxos e uretano, e possui massa molecular de, aproximadamente, 65 kDa.

Filogeneticamente, *S. liquefaciens* é agrupada em um complexo de espécies junto com *S. grimesii* e *S. proteamaculans*, conhecido como *S. liquefaciens-like* ou complexo *S. liquefaciens-S. grimesii-S. proteamaculans*, por apresentar características genéticas e bioquímicas muito semelhantes, sendo difícil diferenciar as espécies por métodos de identificação de microrganismos comumente utilizados, como o sequenciamento do gene de RNA ribossomal 16S (BEGREM et al., 2021; GRIMONT; GRIMONT; IRINO, 1982; GRIMONT; GRIMONT; STARRY, 1981). Williams et al. (2022) utilizaram ferramentas de bioinformática baseada em alinhamento de genoma central e sugeriram a inclusão de *S. quinivorans*, anteriormente *S. proteamaculans* subsp. *quinovora*, ao complexo *S. liquefaciens-like*, que passaria a ser composto por quatro espécies.

Begrem et al. (2021) demonstraram que o pangenoma de *S. liquefaciens* apresenta um total de 8.535 sequências de DNA codificadoras (CDS) sendo que, 4.187 CDS constituem o genoma central da espécie. Além disso, os autores também demonstraram que as demais CDS representavam o genoma variável, que é constituído por CDS presentes em um único genoma ou compartilhado de alguns genomas da espécie. Foi estimado que a proporção de CDS variáveis que compõe o genoma acessório em *S. liquefaciens* é de  $20 \pm 5\%$ , contudo, o número de CDS e a proporção de cada categoria varia de acordo com cada isolado (BEGREM et al., 2021). Entretanto, apesar da relevância de *S. liquefaciens* em alimentos, são poucas as informações disponíveis sobre a estrutura do genoma da espécie. Portanto, são necessários mais estudos sobre o repertório genético de *S. liquefaciens* buscando entender as relações genotípicas e fenotípicas da espécie com o ambiente, além de possibilitar explorar o potencial biotecnológico e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do microrganismo em alimentos.

A demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis, mais naturais e seguros têm fortalecido a busca por novos processos e antimicrobianos naturais que garantam a segurança e a qualidade dos alimentos, sem comprometer suas características originais (GARCÍA et al., 2010; WORAPRAYOTE et al., 2015; YI et al., 2022). A adição de conservantes naturais, obtidos de plantas, animais e microrganismos em alimentos é alternativa que pode ser utilizada para salvaguardar a segurança dos mesmos (LEI et al., 2022). Considerada o peptídeo antimicrobiano mais utilizado pela indústria de alimentos e mais estudado, nisina é uma bacteriocina da Classe I, também chamada de lantibiótico. É carregada positivamente e possui, em sua estrutura, aminoácidos incomuns como lantionina, dehidroburitina, dehidroalanina e  $\beta$ -metil lantionina, que são inseridos na cadeia polipeptídica por modificações pós-tradução (BREUKINK; DE KRUIJFF, 2006; KLAENHAMMER, 1993;

ROLLEMA et al., 1995; WU et al., 2023). Nisina tem estabilidade e solubilidade aumentadas em baixo pH e suporta ser autoclavada a 121°C sem perda de suas propriedades (MAURÍCIO et al., 2017; ROLLEMA et al., 1995). Identificada em 1928 em culturas de leite fermentado, nisina tem seu uso permitido como conservante de alimentos desde 1950, podendo ser utilizada em queijos, saladas, sopas enlatadas, *milkshakes*, entre outros (KHAN; OH, 2016; SHIN et al., 2016). Nisina teve *status* GRAS (Geralmente Reconhecida como Seguro) concedido em 1988, pela *Food and Drug Administration* (FDA) por apresentar ação antimicrobiana em baixas concentrações, não apresentar toxicidade contra células eucarióticas, ser hidrolisada por enzimas digestivas e não alterar as propriedades sensoriais dos produtos (BALCIUNAS et al., 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; KRIVOROTOVA et al., 2016)

Nisina é um bioconservante sintetizado principalmente por bactérias do ácido láctico, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é composta por 34 resíduos de aminoácidos e possui um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas (MAŁACZEWSKA; KACZOREK-ŁUKOWSKA, 2021; YELURI JONNALA et al., 2021). A membrana externa de bactérias Gram-negativas as torna resistentes a ação de nisina, sendo necessária a presença de agentes capazes de desestabilizar a membrana para que a bacteriocina consiga afetar estes microrganismos (MAURÍCIO et al., 2017; PRUDÊNCIO; VANETTI; PRIETO, 2015). Prudêncio et al. (2015) observaram que a associação de nisina com EDTA foi eficaz na inibição do crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Além disso, Galvão et al. (2015) realizaram experimentos em diferentes temperaturas, 55°C e -26°C, combinadas com a aplicação de nisina (500 UA/mL) e observaram a redução da população de *Salmonella* Typhimurium em 4 e 3,5 ciclos logarítmicos, respectivamente. A ação conjunta de nisina e ultrassom, conforme avaliado por Freitas et al. (2019), causou a redução de cinco ciclos logarítmicos na população de *Shigella flexneri*. Alguns autores têm demonstrado que, embora nisina, não tenha considerável atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas, pode causar outros efeitos sobre as células bacterianas. Prince et al. (2016) observaram que a concentração de 12 µM de nisina induziu a formação de protusões na membrana de *Escherichia coli*. Felipe (2016) demonstrou que 200 UA/mL de nisina não afetou o crescimento de *S. liquefaciens* em meio de cultivo suplementado com leite desnatado, mas foi capaz de reduzir a atividade proteolítica nas temperaturas 7 °C e 30 °C. Ribeiro (2018) observou que nisina não tem ação bactericida contra isolados de bactérias Gram-negativas, previamente identificadas como *P. fluorescens*, inoculadas em leite mantido a 25 °C, mas inibiu, significativamente, as atividades proteolítica e lipolítica destes isolados.

Considerando o potencial deteriorador de *S. liquefaciens* em produtos alimentícios e da importância de se conhecer o genoma e buscar alternativas que visem controlar a atividade bacteriana sobre os constituintes do leite, o objetivo deste trabalho foi contribuir com os conhecimentos acerca das características genéticas de *S. liquefaciens*, isolado de amostra de leite cru refrigerado, utilizando ferramentas de bioinformática para analisar o genoma sequenciado. Além disso, objetivou-se acrescentar informações para a compreensão do mecanismo de inibição da atividade enzimática de *S. liquefaciens* em leite por nisina.

## 2. Referências bibliográficas

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: Proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2004.

BEGREM, S. et al. Genomic diversity of *Serratia proteamaculans* and *Serratia liquefaciens* predominant in seafood products and spoilage potential analyses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 354, 2021.

BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 321–323, 2006.

DIB, A. L. et al. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from fish and seafood. **Food Control**, v. 88, p. 54–60, 2018.

FELIPE, F. O. **Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica de *Serratia liquefaciens***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.

FREITAS, L. L. DE et al. Modeling of *Shigella flexneri* inactivation by combination of ultrasound, pH and nisin. **LWT Food Science and Technology**, v. 109, p. 40–46, 2019.

GALVÃO, M. F.; PRUDÊNCIO, C. V.; VANETTI, M. C. D. Stress enhances the sensitivity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to bacteriocins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1137–1143, 2015.

GARCÍA, P. et al. Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science and Technology**. v. 21, p. 373-382, 2010.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; STARR, M. P. *Serratia* species isolated from plants. **Current Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 317–322, 1981.

GRIMONT, P. A. D.; IRINO, K.; GRIMONT, F. The *Serratia liquefaciens*-*S. proteamaculans*-*S. grimesii* complex: DNA relatedness. **Current Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 63–67, 1982.

HAHNE, J. et al. The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. **Food Microbiology**, v. 79, p. 11–19, 2019.

HE, Y. et al. Preservative effect of slightly acid electrolysed water ice generated by the developed sanitising unit on shrimp (*Penaeus vannamei*). **Food Control**, v. 136, 2022.

HOSPITAL, X. F. et al. Effect of nitrate and nitrite on *Listeria* and selected spoilage bacteria inoculated in dry-cured ham. **Food Research International**, v. 101, p. 82–87, 2017.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Food Protection with chemicals, and by biocontrol. In: **Modern Food Microbiology**. 7. ed. Boston: Springer US, 2005. v. 5p. 301–343.

KAIBARA, F. et al. Construction of serralyisin-like metalloprotease-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* and their virulence in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 81, n. 1, p. 55–61, 2012.

KHAN, I.; OH, D.-H. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 376–384, 2016.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1–3, p. 39–85, 1993.

KRIVOROTOVA, T. et al. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 49–56, 2016.

LEI, W. et al. Partial purification and application of a bacteriocin produced by probiotic *Lactococcus lactis* C15 isolated from raw milk. **LWT Food Science and Technology**, v. 169, 1 nov. 2022.

LOSANTOS, A. et al. Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated from spoiled dry-cured hams. **Food Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 505–512, 2000.

MACHADO, S. G. et al. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842–M1849, 2015.

MACHADO, S. G. et al. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 65–71, 2016.

MACHADO, S. G. et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

MAŁACZEWSKA, J.; KACZOREK-ŁUKOWSKA, E. Nisin — A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. **Peptides**, v. 137, p. 170479, 2021.

MARCOS, P. et al. The effect of cold storage and cooking on the viability of *Clostridioides difficile* spores in consumer foods. **Food Microbiology**, p. 104215, 2023.

MARTELLI, F. et al. Novel insights on pink discoloration in cheese: The case of Pecorino Toscano. **International Dairy Journal**, v. 111, 2020.

MAURÍCIO, E. et al. Efficiency of nisin as preservative in cosmetics and topical products. **Cosmetics**, v. 4, n. 4, 2017.

ODEYEMI, O. A. et al. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 311–331, 2020.

PRINCE, A. et al. Lipid-II independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

PRUDÊNCIO, C. V.; VANETTI, M. C. D.; PRIETO, M. Tolerance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition. **Food Research International**, v. 69, p. 281–288, 2015.

RIBEIRO, L. C. **Inibição das atividades proteolítica e lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* por nisina**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2018.

ROLLEMA, H. S. et al. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. **Applied and environmental microbiology**. v. 61, n. 8, p. 2873-2878, 1995.

SÄDE, E.; MURROS, A.; BJÖRKROTH, J. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 252–258, 2013.

SALGADO, C. A. et al. Identification and characterization of a polyurethanase with lipase activity from *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw cow's milk. **Food Chemistry**, v. 337, 2021.

SAMAPUNDO, S.; DE BAENST, I.; AERTS, M.; CNOCKAERT, M.; DEVLIEGHERE, F.; VAN DAMME, P. Tracking the sources of psychrotrophic bacteria contaminating chicken cuts during processing. **Food Microbiol.** v. 81, p. 40-50, 2019.

SHIN, J. M. et al. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449–1465, 2016.

SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W. The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. **Food Control**, v. 85, p. 144–150, 2018.

STEIN, M. et al. Complete genome sequence of tetracycline-resistant *Serratia liquefaciens* S1, isolated from mixed greens, obtained using Illumina MiSeq and Oxford Nanopore MinION Sequencing. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 19, 2020.

STERNIŠA, M. et al. Targeting fish spoilers *Pseudomonas* and *Shewanella* with oregano and nettle extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 328, 2020.

WICKRAMASINGHE, N. N. et al. Transcriptional profiling of biofilms formed on chilled beef by psychrotrophic meat spoilage bacterium, *Pseudomonas fragi* 1793. **Biofilm**, v. 3, 2021.

WILLIAMS, D. J. et al. The genus *Serratia* revisited by genomics. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022.

WORAPRAYOTE, W. et al. Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. **Food Control**, v. 55, p. 176–184, 2015.

WU, M. et al. A review of potential antibacterial activities of nisin against *Listeria monocytogenes*: the combined use of nisin shows more advantages than single use. **Food Research International**, v. 164, p. 112363, 2023.

YANG, X. et al. The complex community structures and seasonal variations of psychrotrophic bacteria in raw milk in Heilongjiang Province, China. **LWT Food Science and Technology**, v. 134, 2020.

YELURI JONNALA, B. R. et al. Assessing the ability of nisin A and derivatives thereof to inhibit gram-negative bacteria from the genus *Thermus*. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 2632–2640, 2021.

YI, Y. et al. Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: structure, mode of action and applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, p. 387–401, 2022.

YUAN, L. et al. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. **LWT Food Science and Technology**, v. 84, p. 409–418, 2017.

**CAPÍTULO 1 - Sequenciamento e análise do genoma de *Serratia liquefaciens*  
isolada de leite**

## 1. Introdução

*Serratia* é um gênero de bactérias Gram-negativas que pertence a classe Gammaproteobacteria, ordem *Enterobacterales* e família *Yersiniaceae* (ADEOLU et al., 2016). Representado por mais de dez espécies identificadas e caracterizadas por diferentes metodologias como hibridização DNA-DNA, testes bioquímicos e fisiológicos, *Serratia* é um gênero diversificado que pode ser encontrado em diferentes ambientes como solo, água, plantas, animais e o homem (GRIMONT; GRIMONT, 2006; WILLIAMS et al., 2022). Além disso, são contaminantes de alimentos ricos em proteínas como carnes, frutos do mar e produtos lácteos (FOUGY et al., 2017; MACHADO et al., 2015). Diversas espécies de *Serratia* são associadas à deterioração de alimentos levando a perdas e desperdícios que acarretam em prejuízos econômicos e ambientais (GUSTAVSSON et al., 2011).

Organismos membros do gênero *Serratia* são capazes de secretar diversas enzimas hidrolíticas como quitinase, protease, nuclease, lipase, hemolisina e gelatinase (CHEN; BLOM; WALKER, 2017; FEKRIRAD; KASHEF; AREFIAN, 2019; JUPATANAKUL et al., 2020; LUO et al., 2021). A secreção de enzimas hidrolíticas é fundamental para as bactérias uma vez que estas enzimas desempenham um importante papel em vários processos microbianos como a patogênese e absorção de nutrientes (CEZAIIRLIYAN; AUSUBEL, 2017). Estas enzimas auxiliam as bactérias a sobreviver em ambientes com nutrientes limitados, quebrando macromoléculas complexas em moléculas menores que podem ser utilizadas como nutrientes para o crescimento microbiano (CEZAIIRLIYAN; AUSUBEL, 2017; RENNEBERG, 2023).

Entre os organismos pertencentes ao gênero *Serratia*, a espécie *Serratia marcescens*, patógeno oportunista nosocomial e também reportada como deterioradora de alimentos, é a mais estudada (CANESCHI et al., 2019; CASALTA et al., 2009; PRADO et al., 2022). A ingestão de alimentos contaminados com *S. marcescens* pode levar a infecções em diversos locais do corpo, como trato urinário, sistema respiratório, epitélio, músculos e intestino (OCHIENG et al., 2015). Além de *S. marcescens*, outras espécies do gênero estão relacionadas com a deterioração de alimentos, como as pertencentes ao complexo de espécies geneticamente relacionadas, incluindo *S. proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *S. quinivorans* e *S. grimesii* (GRIMONT; GRIMONT; IRINO, 1982).

*S. liquefaciens* é frequentemente reportada como um deteriorador de alimentos refrigerados, incluindo frutos do mar (BEGREM et al. 2021), queijos (MARTELLI et al., 2020; MORALES et al., 2003), leite cru (MACHADO et al., 2015) e presunto cozido (ZAGDOUN

et al., 2020). Esta bactéria é capaz de sintetizar enzimas termorresistentes, como proteases e lipases, que mantêm atividade residual após os tratamentos térmicos utilizados pela indústria de alimentos (MACHADO et al., 2016; SALGADO; BAGLINIÈRE; VANETTI, 2020). García et al. (2000) isolaram *S. liquefaciens* a partir de amostras de presuntos ibéricos apresentando mau cheiro, identificando a espécie como um dos contaminantes presentes responsável pela deterioração do produto. Machado et al. (2015) verificaram que *S. liquefaciens* (73,9%) e *Pseudomonas* spp. (26,1%) foram os psicrotróficos dominantes com alto potencial de deterioração em amostras de leite cru provenientes de fazendas produtoras na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O potencial proteolítico e lipolítico dos isolados de *S. liquefaciens* obtidos por Machado et al. (2015) foi explorado por Baglinière et al. (2017) e Salgado et al. (2020). Foi observado que diferentes isolados de *S. liquefaciens* apresentam capacidade de hidrolisar os constituintes do leite devido a atividade enzimática, revelando o potencial deteriorador da espécie (BAGLINIÈRE et al., 2017). Wang et al. (2017) isolaram *S. liquefaciens* de carne de frango refrigerada e demonstraram que a bactéria possui potencial de deterioração proteolítica da fração proteica miofibrilar da carne. Em estudo de Yazgan et al. (2019), *S. liquefaciens* foi isolada e identificada como parte da microbiota contaminante de amostras de peixes deteriorados. *S. liquefaciens* foi isolada de maçãs, sendo apontada como responsável pela podridão da fruta, caracterizada por lesões marrons (KHALIFA, 2022).

Apesar da importância de *S. liquefaciens* como deteriorador de alimentos, poucos estudos descrevem o repertório genético dessa espécie. Até julho de 2022, apenas oito isolados de *S. liquefaciens* possuíam os genomas completamente sequenciados depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Este trabalho visa aumentar os conhecimentos científicos sobre as características moleculares de *S. liquefaciens* por meio da realização de análises genotípicas detalhadas.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Bactéria usada e condições de cultivo

A estirpe *S. liquefaciens* L211 foi isolada de amostra de leite cru proveniente de fazenda localizada em Minas Gerais, Brasil e identificada por Machado (2015). A cultura foi armazenada a -80 °C em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia, Thane, Maharastra, India) com glicerol 20% v/v. Antes de cada experimento, *S. liquefaciens* L211 foi cultivada a 30 °C por 24 horas, transferindo-se uma alíquota de 20 µL das células armazenadas a -80 °C para tubos contendo 5 mL de caldo Luria Bertani (LB - Neogen, Lansing, Michigan, Estados Unidos).

### 2.2. Extração do DNA

A cultura de *S. liquefaciens* L211 foi cultivada em caldo LB a 30 °C por 18 horas e o DNA genômico foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e a quantidade de DNA e a razão  $A_{280}/A_{260}$  foram determinadas por espectrofotometria utilizando Nanodrop™ 2000c Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). A amostra de DNA foi armazenada a -20°C antes de ser encaminhada para sequenciamento.

### 2.3. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

A sequência de DNA de *S. liquefaciens* L211 foi gerada utilizando o dispositivo de sequenciamento Oxford Nanopore MinION MK1B. O *pipeline* Guppy v.2.3.1 foi utilizado para extrair o arquivo FASTQ do arquivo FAST5, originado ao final do sequenciamento. O controle de qualidade dos dados do sequenciamento foi realizado utilizando a ferramenta FastQC Alternative Code (Falco) (DE SENA BRANDINE; SMITH, 2019). As *reads* brutas foram trimadas com Nanofilt utilizando *headcrop* de 250, 100 e *scores* de qualidade Q10 (DE COSTER et al., 2018). A montagem do genoma foi realizada com o algoritmo Flye (KOLMOGOROV et al., 2019). A anotação do genoma foi feita com Prokka 1.14.5 e o servidor

web *The Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) foi utilizado para verificar a anotação funcional das sequências codificantes (CDS) (OVERBEEK et al., 2014; SEEMANN, 2014). Após a anotação, a ferramenta DNAPlotter foi empregada para desenhar o mapa circular do genoma de *S. liquefaciens* L211.

#### 2.4. Análise da inserção de profagos

A inserção de profagos no genoma de *S. liquefaciens* L211 foi avaliada utilizando o *software* Phage Search Tool Enhanced Release (PHASTER), disponível em <https://phaster.ca/> (ARNDT et al., 2016). Primeiramente, o *software* busca genes que são semelhantes a genes de fagos. Em seguida, é verificado se essas sequências são abundantes o suficiente para serem consideradas derivadas de fagos e é atribuída uma pontuação baseada no número dessas sequências que são correspondentes a genes de fagos conhecidos (RAHIMI et al., 2018). As regiões são então, classificadas como intactas (pontuação > 90), questionáveis (pontuação 70-90) e incompletas (pontuação < 70). A pontuação é baseada no tamanho da região e no número de genes. A pontuação máxima é de 150 indicando que a região contém apenas genes de fagos (RAHIMI et al., 2018).

#### 2.5. Identificação de ilhas genômicas

O *IslandViewer* 4.0 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) foi utilizado para identificar a inserção de ilhas genômicas no genoma de *S. liquefaciens* L211 (BERTELLI et al., 2017). *IslandViewer* 4 utiliza três algoritmos para identificação das ilhas genômicas. O algoritmo *IslandPath-DIMOB* auxilia na identificação de genes de mobilidade e ilhas genômicas de bactérias. SIGI-HMM é o algoritmo utilizado para identificar as ilhas genômicas e medir o uso de códons. *IslandPick*, por sua vez, é o método de genômica comparativa utilizado para prever ilhas genômicas e montar conjunto de dados que formam ou não ilhas genômicas.

## 2.6. Predição de *cluster* de genes biossintéticos (BGCs)

A plataforma online *AntiSMASH* 6.1.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) foi utilizada para prever *clusters* gênicos biossintéticos (BLIN et al., 2021). O genoma foi carregado em um arquivo de extensão .gbk e a anotação dos *clusters* biossintéticos foi realizada utilizando os recursos padrões *KnowClusterblast*, *MIBiG cluster comparison*, *Cluster Pfam analysis*, *ClusterBlast*, *ActiveSiteFinder*, *Pfam-based GO term annotation*, *SubClusterBlast*, *RREFinder* e *TIGRFam analysis*.

## 2.7. Alinhamento e análise comparativa do genoma

A ferramenta *BLAST Ring Image Generator* (BRIG) foi utilizada para realizar alinhamento múltiplo e analisar as regiões conservadas do genoma de *S. liquefaciens* L211 comparadas com o genoma de outros oito isolados da mesma espécie com genoma completo sequenciado e anotado depositados no banco de dados NCBI, conforme tabela 1 (ALIKHAN et al., 2011).

Tabela 1. Isolados de *S. liquefaciens* utilizados para análises de genômica comparativa

Estirpe	Número de acesso NCBI	Fonte de isolamento	Referência
L211	Ainda não depositado	Leite	Este trabalho
ATCC 27592	CP006252.1	Isolado ambiental	Nicholson et al. (2013)
FDAARGOS_125	CP014017.2	Homem	Não publicado
HUMV-21	CP011303.1	Homem	Lázaro-Díez et al. (2015)
S1	CP048784.1	Salada de verduras	Stein et al. (2020)
MT49	CP061082.1	Água subterrânea de poço	Não publicado
JL02	CP048043.1	Leite	Não publicado
FG3	CP033893.1	Flor de <i>Stachytarpheta glabra</i>	Caneschi et al. (2019)
FDAARGOS_1081	CP068148.1	Não informado	Não publicado

A previsão de possíveis rearranjos no genoma, incluindo inserções, inversões e translocações foi realizada com o *software* Mauve, utilizando o algoritmo de alinhamento progressivo (DARLING et al., 2004). O alinhamento foi realizado utilizando os parâmetros padrões do programa. Mauve utiliza sistema de alinhamentos múltiplos de genomas completos identificando Blocos Localmente Colineares (LCBs) prevendo, desta forma, eventos evolutivos

como rearranjos e inversões, e ainda regiões livres de rearranjos genômicos (DARLING et al., 2008).

## 2.8. Cálculo da Identidade Média de Nucleotídeos (ANI – *Average Nucleotide Identity*) e análise filogenética

Análise filogenética *in silico* entre os isolados de *S. liquefaciens*, citados na tabela 1, foi realizada utilizando as plataformas *JSpecies* (RICHTER et al., 2016) disponível em <https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>, e *Type (Strain) Genome Server* (TYGS), disponível em <https://tygs.dsmz.de> (Meier-Kolthoff et al., 2022).

*JSpecies* foi utilizado para calcular a Identidade Média de Nucleotídeos baseado no alinhamento do BLAST (ANIb) entre o genoma de *S. liquefaciens* L211 e demais genomas de isolados de *S. liquefaciens*, utilizando os parâmetros padrões da plataforma. Foi adotado valor de corte de >95% para delinear o limite de espécie (CHUN et al., 2018).

Na plataforma TYGS, utilizando as condições padrões, os genomas foram comparados, par-a-par, com o algoritmo Filogenia de Distância do Genoma Blast (GBDP - *Genome BLAST Distance Phylogeny*), e as distâncias intergenômicas foram medidas pelo algoritmo *triming* e fórmula de distância d5. A Calculadora de Distância Genoma a Genoma 3.0 (GGDC – *Genome-to-Genome Distance Calculator*) foi utilizada para determinar os valores de Hibridização Digital DNA-DNA (dDDH – *Digital DNA-DNA Hybridization*) entre os isolados de *S. liquefaciens* listados na tabela 1. Foram adotados valores de dDDH >70% como limites para definir se os microrganismos pertencem à mesma espécie (CHUN et al., 2018).

As distâncias intergenômicas encontradas foram utilizadas para construir a árvore filogenética, baseada nos genomas completos, utilizando o algoritmo FASTME 2.1.6.1 com 100 réplicas *pseudo-bootstrap* para suporte a ramificações, conforme definido pelo do TYGS (LEFORT; DESPER; GASCUEL, 2015). A árvore foi enraizada no ponto médio.

## **2.9. Avaliação de características fenotípicas de *S. liquefaciens* L211**

### **2.9.1. Motilidade**

A motilidade de *S. liquefaciens* L211 foi verificada em placas de Petri contendo diferentes concentrações de ágar LB. As motilidades do tipo *swimming* e *swarming*, foram avaliadas ágar nas concentrações de 0,3% e 0,7%, respectivamente, de acordo com Nievas et al. (2012). A motilidade do tipo *twitching* foi verificada em meio LB contendo 1,5% de ágar, conforme protocolo descrito por Haley et al. (2014).

*S. liquefaciens* L211 foi previamente inoculada em caldo LB e incubada a 30° C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi transferida para microtubos de 1,5 mL e centrifugada a 10.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com solução salina 0,85% e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de solução de salina 0,85% e 1 gota de 5 µL da amostra foi inoculada no centro de cada uma das placas contendo ágar LB. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias. Ao final do período de incubação, as placas foram avaliadas para verificar a ocorrência de motilidade e fotografadas. As colônias formadas no meio de cultura com 1,5% de ágar, utilizado para determinar a motilidade tipo *twitching*, foram observadas em microscópio invertido, para visualização das projeções das bordas da colônia.

### **2.9.2. Produção de sideróforos**

A produção de sideróforos foi avaliada conforme Caballero-Mellado et al. (2007), com modificações. *S. liquefaciens* L211 foi cultivada em 10 mL de caldo LB a 30 °C por 24 horas. Em seguida, 10 µL da cultura foram coletados e depositados em placa contendo ágar casaminoácidos (CAA) com restrição de ferro e adicionado de 25% de solução de Cromo Azurol S (CAS). As placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. A conversão da cor azul para amarelo do meio de cultura contendo CAS indicou a produção de sideróforo.

### 2.9.3. Atividades enzimáticas

O potencial proteolítico de *S. liquefaciens* L211 foi avaliado utilizando ágar leite, preparado adicionando-se 1% de leite em pó desnatado reconstituído ao Ágar Padrão (Neogen, Lansing, Michigan, Estados Unidos). *S. liquefaciens* foi cultivada em caldo LB por 24 horas a 30 °C. Uma alíquota de 1 mL foi coletada e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes e ressuspenso em 1 mL de solução salina 0,85%. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi adicionada na superfície do ágar leite e incubada por 24 horas a 30 °C. Após esse período, a atividade proteolítica foi avaliada pela formação de halo claro ao redor da colônia.

Para verificar se *S. liquefaciens* secreta enzimas com atividade lipolítica e de poliuretase foram utilizados ágar LB adicionado de 0,5% (v/v) de tributirina ou 1% de Impranil™, respectivamente. O isolado foi cultivado conforme descrito no item 2.9. O volume de 20 µL da suspensão de células foi adicionado na superfície do meio tributirina para determinação da atividade lipolítica. A placa foi incubada por 24 horas a 30 °C. A atividade de poliuretase foi identificada fazendo estrias em placa contendo ágar adicionado do substrato Impranil™, seguindo-se de incubação por até 8 dias a 30 °C. As atividades lipolítica e de poliuretase foram identificadas pela formação de halo claro ao redor das colônias após o período de incubação.

### 3. Resultados

#### 3.1 Características gerais do genoma de *S. liquefaciens* L211

A montagem do genoma de *S. liquefaciens* L211 resultou em apenas um contig de tamanho aproximado de 5.452.746 pb, compreendendo um total de 6.041 sequências codificadoras (CDS), sendo 5.932 de genes putativos, 22 genes de rRNAs, 86 genes codificantes de tRNA, 1 sequência codificante de tmRNA, e conteúdo G+C de 55,3% (Figura 1). Não foram detectados plasmídeos.

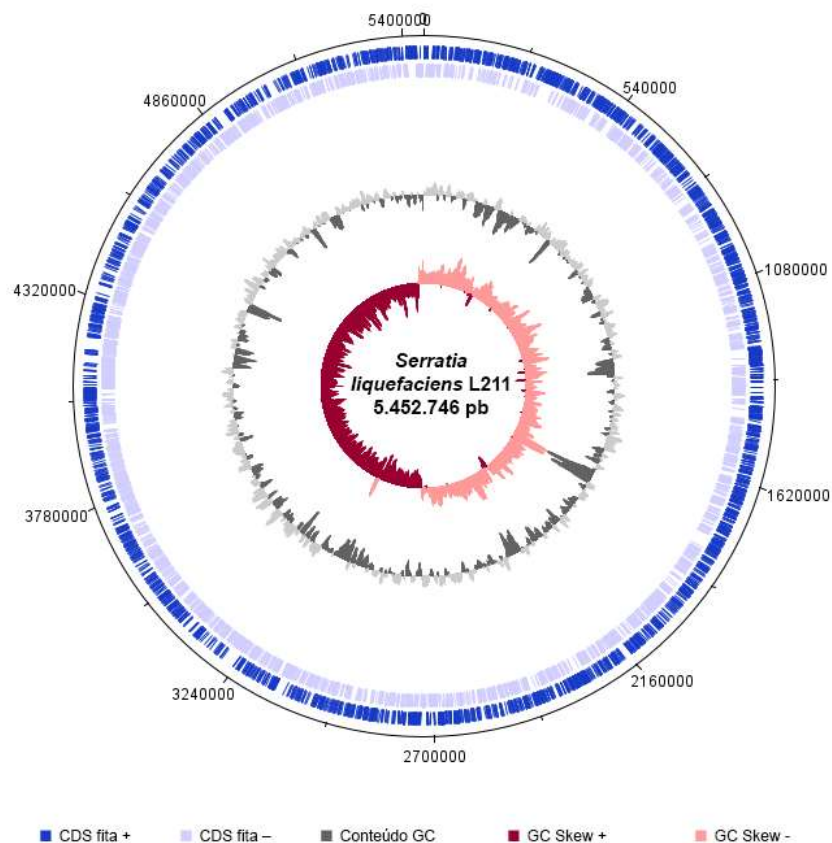


Figura 1. Mapa circular do cromossomo de *S. liquefaciens* L211. Círculo com barras em azul escuro representa as sequências codificadoras (CDS) dos genes anotados na fita positiva, enquanto o círculo com barras em azul claro representa as CDS da fita negativa do DNA. Círculo cinza representa conteúdo GC. Círculos rosa e vinho representam GC Skew.

O servidor RAST atribuiu funções a 3.439 CDS (58%) distribuídas em 583 subsistemas (Figura 2), sendo os “carboidratos” (824 genes) os mais abundantes, seguido por “aminoácidos e derivados” (646 genes), “cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos” (326 genes), “metabolismo de proteínas” (293 genes) e “metabolismo de RNA” (282 genes).

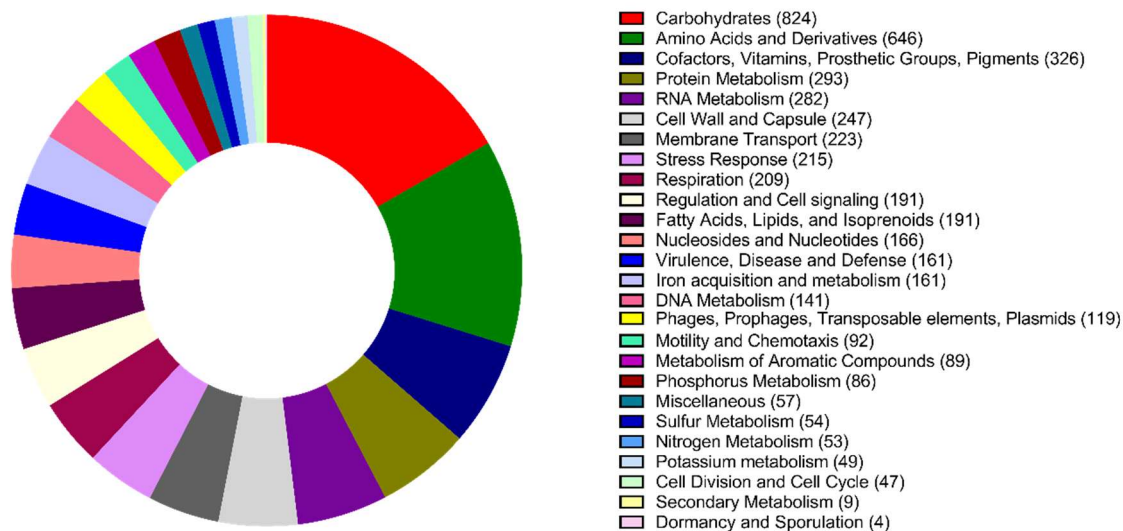


Figura 2. Subsistemas do genoma de *S. liquefaciens* L211. Visão da anotação funcional realizada pelo servidor RAST mostrando a distribuição funcional dos genes codificadores em subsistemas. Os números entre parênteses representam o número de genes atribuídos a cada categoria.

O *software* PHASTER identificou nove regiões, de tamanhos variando entre 8,5 a 49,2 kb, caracterizadas como inserções de profagos, sendo cinco regiões intactas, uma região questionável e três regiões incompletas (Figura 3 e Tabela 2). Somadas, essas regiões compreendem um total de 330,7 kb de comprimento, mostrando que, aproximadamente, 6% do genoma do isolado *S. liquefaciens* L211 é composto por DNA relacionado a fagos.

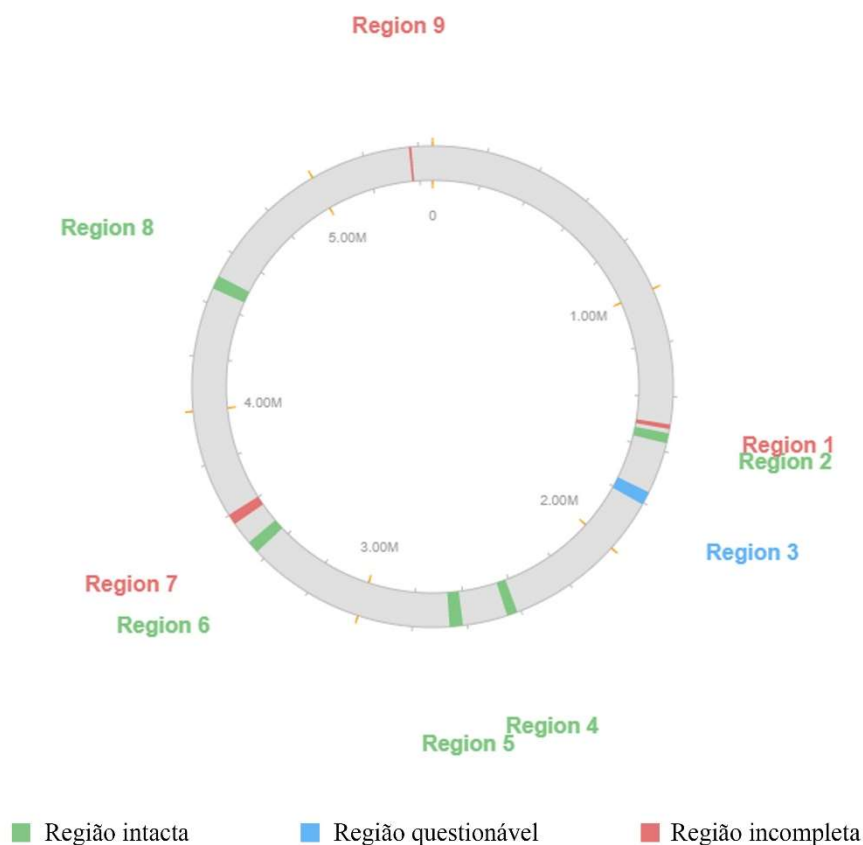


Figura 3. Visualização das áreas de profagos identificadas no genoma de *S. liquefaciens* L211. Mapa circular do genoma mostrando as nove regiões de inserções de profagos no genoma de *S. liquefaciens* L211 identificadas pelo PHASTER.

Tabela 2. Áreas de profagos previstas no genoma de *S. liquefaciens* L211.

Região	Comprimento da região	Nível de Completude	Pontuação	Número de proteínas	Posição no genoma	Fago mais comum	% GC
1	16,7 Kb	Incompleto	50	20	1500316-1517105	PHAGE_Escher_500465_1_NC_049342 (9)	52.36%
2	36,6 Kb	Intacto	150	45	1532557-1569158	PHAGE_Escher_HK75_NC_016160(9)	51.21%
3	49,2 Kb	Questionável	76	52	1757504-1806768	PHAGE_Salmon_SI7_NC_049460(20)	54.53%
4	38,6 Kb	Intacto	150	45	2413930-2452591	PHAGE_Salmon_SP_004_NC_021774(19)	52.76%
5	48,4 Kb	Intacto	150	79	2616295-2664719	PHAGE_Erwini_phiEt88_NC_015295 (25)	49.76%
6	44,8 Kb	Intacto	150	59	3434243-3479046	PHAGE_Integer_mEp460_NC_019716(14)	48.95%
7	38,9 Kb	Incompleto	50	57	3563006-3601973	PHAGE_Klebsi_ST437_OXA245phi4.1_NC_049448(15)	52.30%
8	49 Kb	Intacto	150	72	4454567-4503596	PHAGE_Erwini_vB_EhrS_59_NC_048198(11)	50.12%
9	8,5 Kb	Incompleto	60	8	5366923-5375513	PHAGE_Shigel_SfII_NC_021857(2)	48.66%

Várias ilhas genômicas foram identificadas no genoma de *S. liquefaciens* L211 (Figura 4 e Tabela suplementar 1) com tamanho variando, aproximadamente, entre 3 a 47 Kb. Dos genes presentes nas ilhas genômicas, 564 foram anotados como proteínas hipotéticas, além de genes identificados como elementos móveis, diversas proteínas associadas a fagos, proteínas

de ligação ao ATP e ao DNA, genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, reguladores transcricionais, entre outros.

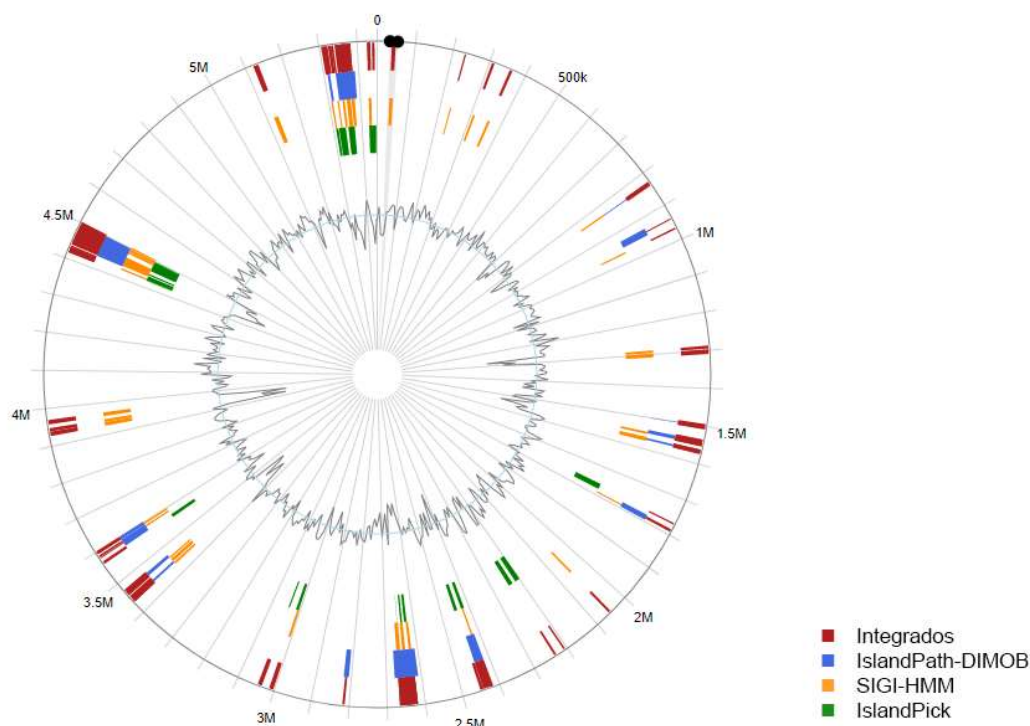


Figura 4. Ilhas genômicas de *S. liquefaciens* L211. As ilhas genômicas foram identificadas utilizando *IslandViewer* 4.0. As ilhas em vermelho indicam a detecção integrada de ilhas genômicas por pelo menos um algoritmo. As ilhas em azul, laranja e verde indicam a detecção de ilhas genômicas pelos algoritmos *IslandPath-DIMOB*, *SIGI-HMM* e *IslandPick*, respectivamente.

A predição de *clusters* gênicos biossintéticos identificou cinco regiões possivelmente envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários. Foram detectadas regiões com genes associados com a síntese de polissacarídeos e antígeno O. Dentre os *clusters* identificados, dois apresentaram genes envolvidos na biossíntese de sideróforos. No *cluster* 1 foram detectados genes de peptídeos não ribossomais (NRPS) relacionados com biossíntese do sideroforo enterobactina. O *cluster* 3 apresenta genes envolvidos na biossíntese do sideroforo aerobactina e também de polienos aril (Figura 5).

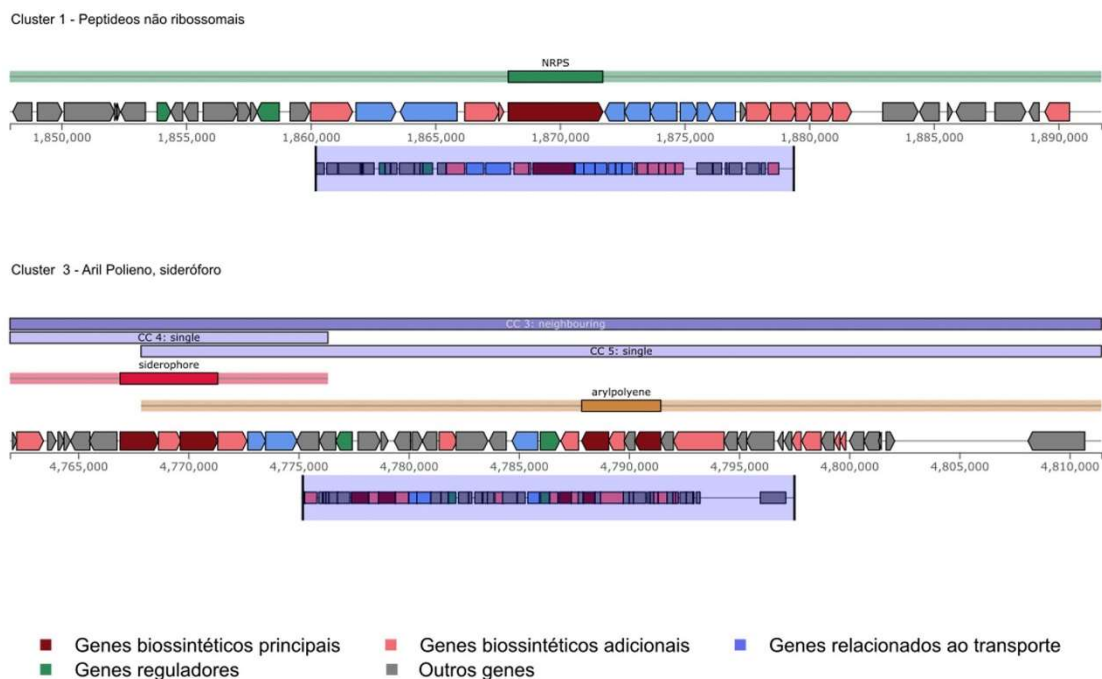


Figura 5. *Cluster* de genes associados à biossíntese de sideróforos. Representação esquemática das regiões contendo genes associados com a biossíntese de sideróforos identificadas utilizando AntiSMASH 6.1.1. Os genes presentes nos *cluster* 1 são relacionados com a biossíntese de enterobactina. O *cluster* 3 apresenta genes associados com a biossíntese do sideróforo aerobactina.

### 3.2 Análises de genômica comparativa

O alinhamento múltiplo e a comparação do genoma de *S. liquefaciens* L211 com os genomas de *S. liquefaciens* depositados no NCBI, feitos utilizando o *software* BRIG, mostraram alto grau de conservação (Figura 6). Alterações na intensidade da cor de um anel em uma determinada região indicariam pontos com variação de identidade de 50, 70 e 100% e não foram observadas nos genomas de *S. liquefaciens* utilizados. As regiões em branco nos anéis (Figura 6) representam pontos em que a identidade é inferior a 50%.

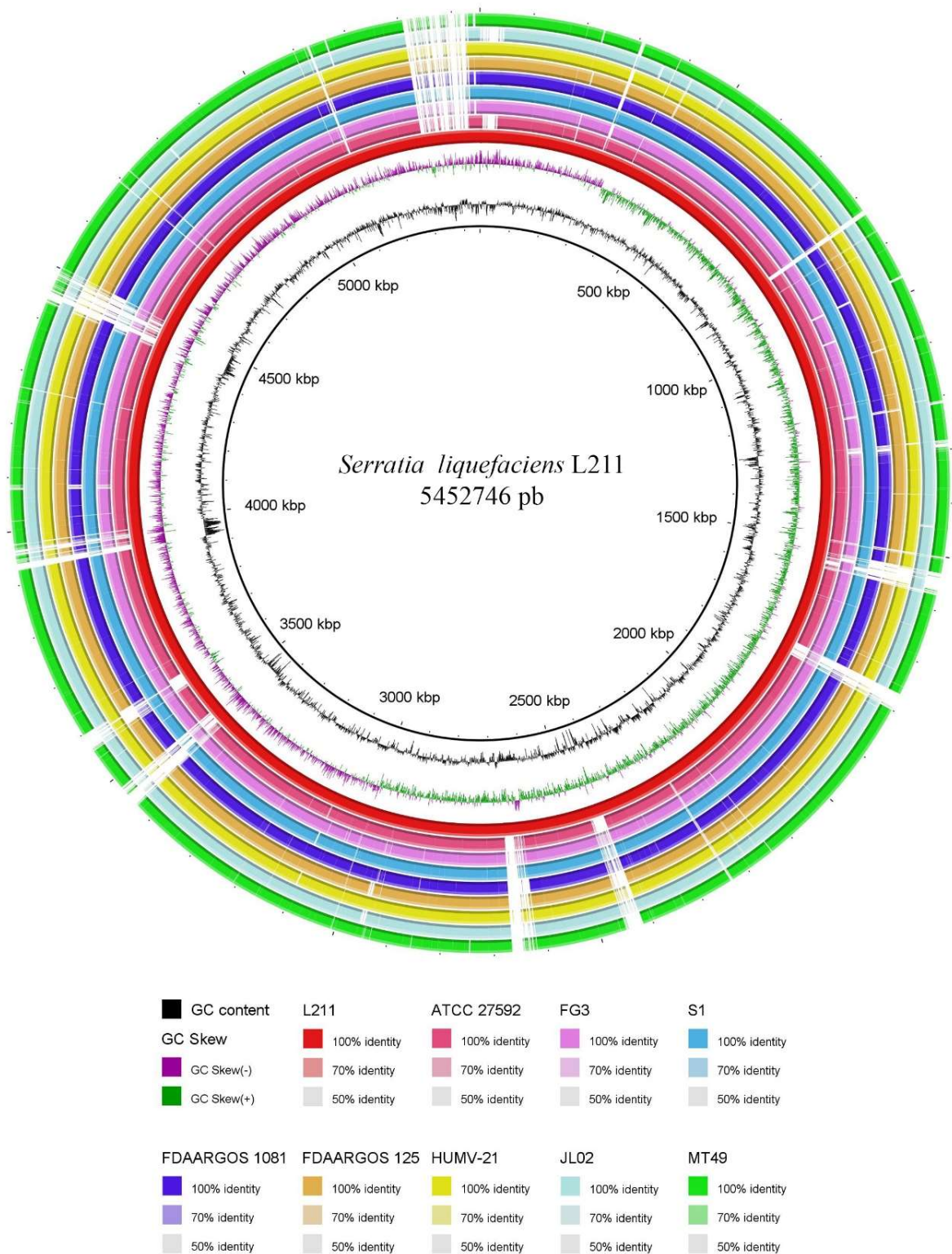


Figura 6. Comparação dos genomas de *S. liquefaciens*. Os genomas de *S. liquefaciens* depositados no NCBI foram alinhados e comparados com o genoma de *S. liquefaciens* L211. Cada anel representa o genoma de um isolado de *S. liquefaciens*.

A análise combinada das ferramentas BRIG, PHASTER e *IslandViewer* 4.0 mostra que, em alguns locais do genoma onde a identidade é inferior a 50%, observadas na análise do BRIG, ocorreram a inserção de fagos, como mostrado pelo resultado obtido no PHASTER (Figura 7). O círculo interno da figura 7, que representa a imagem obtida pelo *IslandViewer* 4.0, fortalece essa observação, uma vez que genes relacionados a fagos foram encontrados nas possíveis ilhas genômicas de *S. liquefaciens* L211.

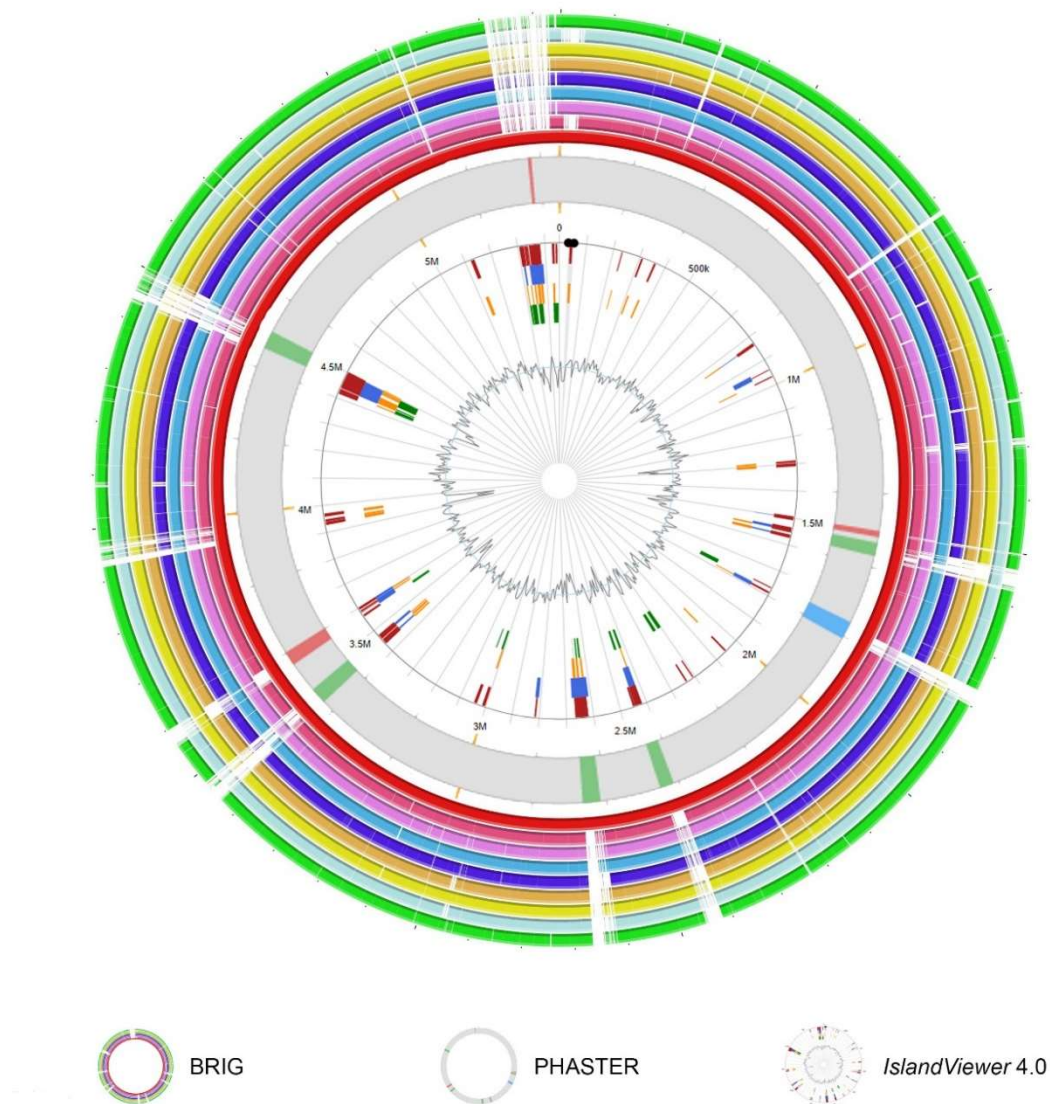
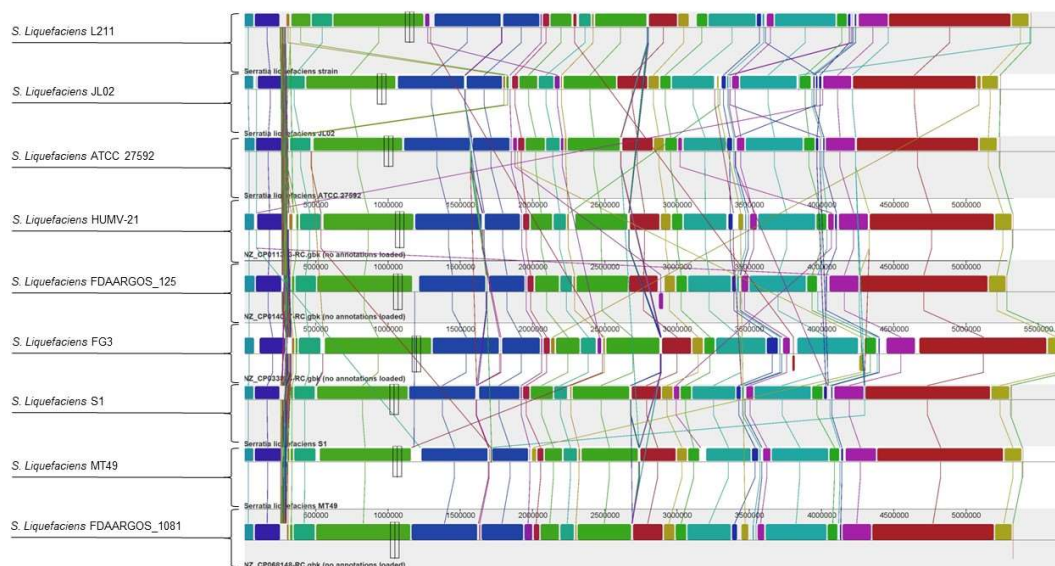


Figura 7. Sobreposição das imagens geradas pelas ferramentas BRIG, PHASTER e *IslandViewer* 4.0. As análises realizadas pelas ferramentas BRIG, PHASTER e *IslandViewer* 4.0 foram comparadas. Os resultados sugerem que as regiões nos genomas onde ocorre variabilidade de identidade, identificadas pelo BRIG, são as mesmas regiões onde foram detectadas as inserções de fagos, pelo PHASTER, e reconhecidas como possíveis ilhas genômicas pelo *IslandViewer* 4.0.

A comparação do genoma de *S. liquefaciens* L211 com os dos oito isolados de *S. liquefaciens* completamente sequenciados disponíveis no NCBI foi realizada por meio de alinhamento múltiplo utilizando o *software* Mauve. A figura 8 mostra a organização e o tamanho dos LCBs compartilhados entre os nove genomas analisados. Regiões homólogas são mostradas como blocos de mesma cor e conectadas por linhas através das sequências. Quando uma região é invertida em relação ao genoma de referência, ela é deslocada para baixo do eixo. As lacunas brancas presentes entre os LCBs significam que nenhum fragmento semelhante foi encontrado em outros genomas. Desta forma, observa-se que os arranjos dos LCBs entre os genomas são bastante semelhantes, ocorrendo pequenos rearranjos e inversões que podem ser resultado de recombinações. Alguns blocos presentes no genoma de L211 são compartilhados apenas com alguns dos isolados. Observa-se que um bloco de *S. liquefaciens* L211 é compartilhado apenas com *S. liquefaciens* FG3, porém, em FG3 este bloco está em uma região invertida do genoma. É possível notar que os genomas apresentam uma ligeira diferença de comprimento entre si, entretanto, a organização dos LCBs é bastante similar entre os isolados de *S. liquefaciens* analisados.

Figura 8. Alinhamento múltiplo dos genomas de *S. liquefaciens* utilizando o *software* Mauve. O



alinhamento completo do genoma de nove isolados de *S. liquefaciens* mostrando que a organização dos Blocos Localmente Colineares (LCBs) é conservada entre todos isolados. Regiões homólogas em cada genoma são mostrados como regiões de cores idênticas ligados por linha entre os genomas. Regiões que aparecem invertidas em relação ao genoma de *S. liquefaciens* L211 estão deslocadas abaixo do eixo central de cada genoma.

### 3.3 Análise filogenética

Os valores de ANI foram calculados, par-a-par, entre o genoma de *S. liquefaciens* L211 e os outros oito genomas completos de *S. liquefaciens* disponíveis no NCBI (Tabela 3). As análises revelaram ANI maior que 97% (Tabela 3) ao se comparar o isolado L211 com os demais isolados, indicando que *S. liquefaciens* L211 pertence à mesma espécie que os demais. Baseando-se nos valores de ANI, *S. liquefaciens* FDAARGOS 125 (98,58%) é a mais relacionada com *S. liquefaciens* L211, seguida por *S. liquefaciens* HUMV-21 (98,48%) e *S. liquefaciens* ATCC 27592 (98,46%). A estirpe *S. liquefaciens* FG3 (97,81%) foi a única cujo valor de ANIb foi menor do que 98%, sendo a menos relacionada com *S. liquefaciens* L211.

A diferença de percentual de guaninas e citosinas entre os genomas analisados, apresentados na tabela 3, foi inferior ao valor limite de 1%, indicando que os microrganismos pertencem à mesma espécie. Comparando o conteúdo G+C entre *S. liquefaciens* L211 e os demais isolados, observa-se que a menor diferença de percentual ocorre com o genoma de *S. liquefaciens* MT49 (0,01%) e a maior diferença ocorre ao se comparar L211 com os genomas de *S. liquefaciens* ATCC 27592 (0,08%) e HUMV-21 (0,08%).

A hibridização digital DNA-DNA forneceu valores acima do limite de 70% proposto por Chun et al. (2018), corroborando com os resultados anteriores de percentual G+C e ANIb. Os menores valores de dDDH podem ser observados ao se comparar *S. liquefaciens* L211 com *S. liquefaciens* FG3, *S. liquefaciens* MT49 e *S. liquefaciens* FDAARGOS 1081, nesta ordem. Os isolados *S. liquefaciens* FDAARGOS 125, *S. liquefaciens* HUMV-21 e *S. liquefaciens* ATCC25792 apresentam os maiores valores de dDDH.

Tabela 3. Tamanho do genoma, Identidade Média de Nucleotídeos (ANIb) e percentual de conteúdo G+C calculados com o algoritmo BLAST (ANIb) e Hibridização Digital DNA-DNA (dDDH) entre isolados *S. liquefaciens*.

Cepa	Tamanho do genoma	ANIb (%)	Conteúdo G+C (%)	Diferença de Conteúdo G+C (%)	dDDH (%)		
					Fórmula d0	Fórmula d4	Fórmula d6
<i>S. liquefaciens</i> L211	5.452.746	*	55.3	*	*	*	*
<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592	5.282.719	98.46	55.4	0.08	90.5	90.3	93.0
<i>S. liquefaciens</i> FDAARGOS_125	5.284.740	98.58	55.3	0.06	89.1	90.8	92.0
<i>S. liquefaciens</i> HUMV-21	5.326.657	98.48	55.2	0.08	90.1	90.4	92.7
<i>S. liquefaciens</i> S1	5.349.947	98.39	55.3	0.05	91.7	90.3	93.8
<i>S. liquefaciens</i> MT49	5.395.544	98.16	55.3	0.01	86.8	87.5	89.7
<i>S. liquefaciens</i> JL02	5.326.548	98.36	55.3	0.04	89.0	90.3	91.8
<i>S. liquefaciens</i> FG3	5.991.142	97.81	55.2	0.07	84.5	86.3	87.7
<i>S. liquefaciens</i> FDAARGOS_1081	5.516.485	98.13	55.3	0.02	87.8	87.9	90.6

A árvore filogenética baseada no genoma completo dos isolados de *S. liquefaciens* foi construída utilizando o servidor web TYGS (Figura 9). Os genomas foram agrupados em dois clados principais. O primeiro ramo é constituído pelos isolados S1, JL02, FDAARGOS 125, L211, ATCC 27592 e HUMV-21. No segundo clado estão incluídos *S. liquefaciens* MT49, FG3 e FDAARGOS 1081.

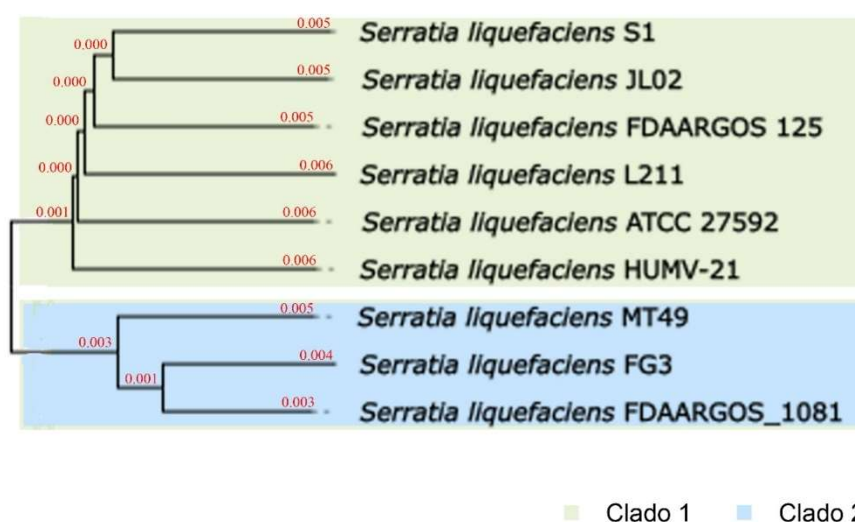


Figura 9. Árvore filogenética baseada no genoma completo de isolados de *S. liquefaciens* construída pela plataforma on-line TYGS. Para o delineamento da árvore foi utilizado o algoritmo FastME 2.1.6.1 baseado nas distâncias calculadas pelo GBDP. Os comprimentos das ramificações foram medidos considerando a fórmula de distância GBDP  $d_5$ . A árvore foi enraizada no ponto médio.

### 3.4 Características fenotípicas de *S. liquefaciens* L211

#### 3.4.1. Motilidade

As motilidades *swimming* e *swarming* de *S. liquefaciens* L211, mediadas por flagelo, foram avaliadas em ágar LB contendo 0,3 e 0,7% de ágar respectivamente. A figura 10 mostra que *S. liquefaciens* L211 apresenta motilidade *swimming* (Figura 10a) e *swarming* (Figura 10b).

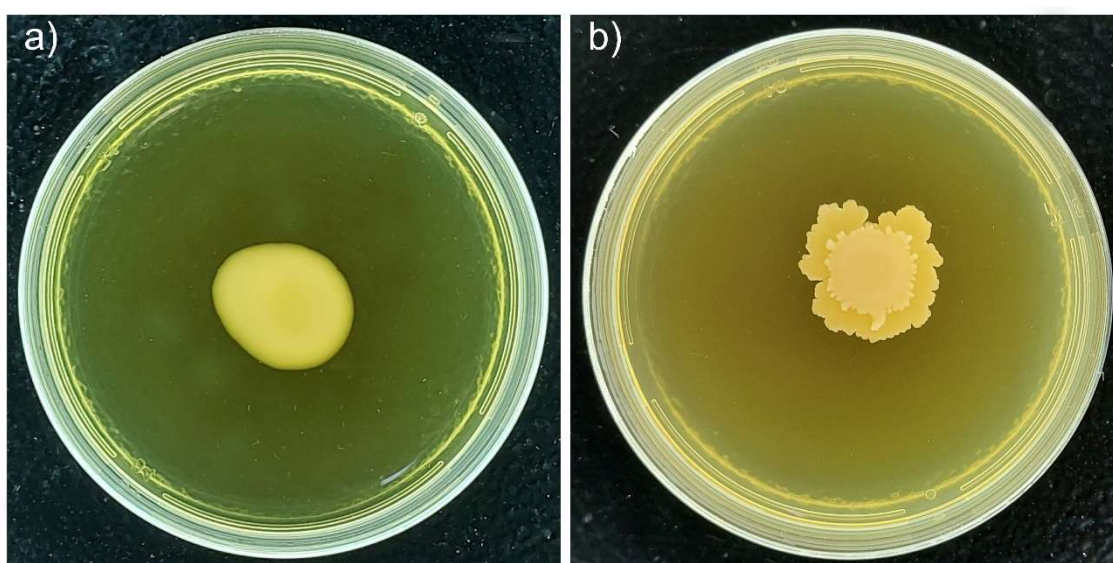


Figura 10. Motilidade *swarming* e *swimming* de *S. liquefaciens* L211. a) Placa contendo meio semissólido LB com concentração de 0,3% de ágar, mostrando que *S. liquefaciens* L211 se locomove pela motilidade do tipo *swimming*. b) Motilidade *swarming* de *S. liquefaciens* L211 em ágar semissólido LB com 0,7% de ágar.

Placas contendo ágar LB com concentração de 1,5% foram utilizadas para avaliar a motilidade *twitching* e, ao final do período de incubação, as colônias foram visualizadas por microscopia óptica. Foi observado que *S. liquefaciens* L211 também apresentou motilidade *twitching* (Figura 11a), sendo capaz de utilizar o pili tipo IV para se locomover. A avaliação microscópica da motilidade *twitching* (Figura 11b) exibiu borda da colônia de *S. liquefaciens* L211 com morfologia irregular, formando uma franja periférica em toda extensão da colônia.

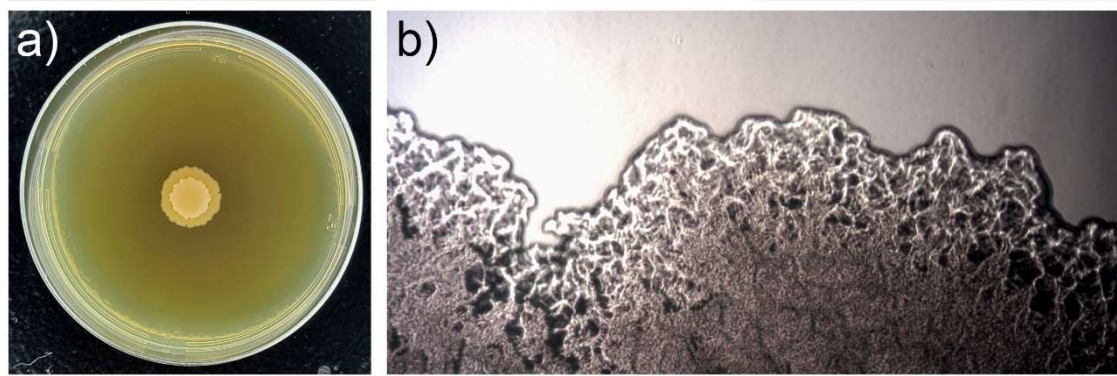


Figura 11. Análise de motilidade *twitching* de *S. liquefaciens* L211. a) Motilidade *twitching* de *S. liquefaciens* L211 em meio sólido LB com concentração de 1,5% de ágar. b) Microscopia óptica das zonas de motilidade *twitching* de *S. liquefaciens* L211 em ágar LB.

### 3.4.2. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos por *S. liquefaciens* L211 foi confirmada em ensaio *in vitro* utilizando ágar CAA adicionado de Cromo Azurol S. A formação de halo claro ao redor da colônia indicou que a bactéria é capaz de sintetizar sideróforo (Figura 12).

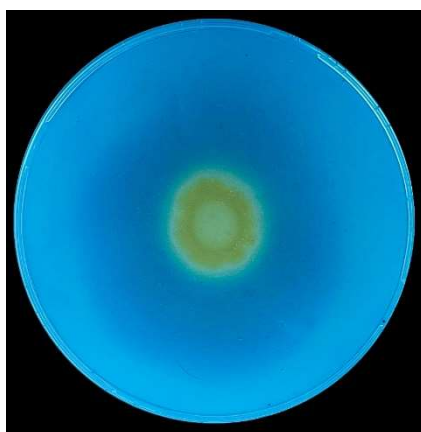


Figura 12. A capacidade de *S. liquefaciens* L211 de produzir sideróforo foi demonstrada pela formação de halo amarelo claro ao redor da colônia em ágar CAA com adição de Cromo Azurol S.

### 3.4.3. Atividade enzimática

A capacidade de produção de enzimas com atividades proteolítica, lipolítica e de poliuretanasase foi avaliada em meio sólido contendo como substrato leite, tributirina e Impranil®, respectivamente, a 30 °C. *S. liquefaciens* L211 mostrou capacidade de síntese de protease em ágar leite (Figura 13a). A formação de halo ao redor da colônia evidencia a atividade proteolítica do microrganismo devido à degradação das proteínas do leite, adicionado ao meio de cultura.

A atividade lipolítica foi detectada em ágar tributirina pela formação de uma zona clara ao redor da colônia (Figura 13b). A adição de tributirina, que é um triglicerídeo de cadeia curta, ao meio de cultura forma uma emulsão, tornando o meio opaco

Para investigar a atividade de poliuretanasase de *S. liquefaciens* L211 estrias foram feitas em ágar LB suplementado com Impranil® e, após a incubação, foi observada a formação de halo de degradação do substrato ao redor das estrias (Figura 13c) em razão da atividade enzimática da bactéria.

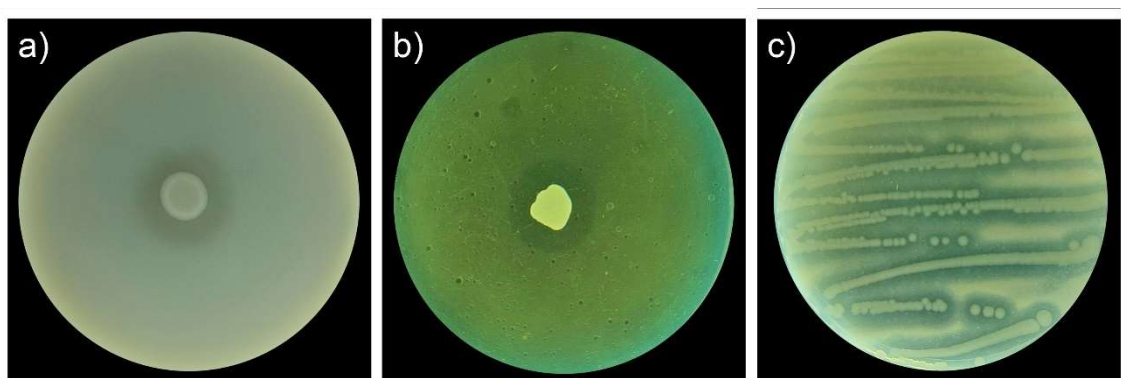


Figura 13. Atividade enzimática de *S. liquefaciens* L211. a) Atividade proteolítica em ágar LB adicionado de 1% leite desnatado reconstituído. b) Atividade lipolítica em ágar tributirina. c) Atividade de poliuretanasase em ágar LB suplementado com 1% de Impranil®. O halo claro ao redor das colônias indica atividade enzimática pela degradação do substrato presente no meio.

## 4. Discussão

Bactérias da espécie *S. liquefaciens* são versáteis e têm a capacidade de adaptação e colonização de diferentes ambientes (CANESCHI et al., 2019). A presença deste microrganismo em alimentos está associada à deterioração de produtos alimentícios (BEGREM et al., 2021b). Apesar disso, há uma carência de estudos que demonstrem os atributos genéticos de *S. liquefaciens* como deterioradora de alimentos.

O sequenciamento do genoma é uma ferramenta fundamental para entender a complexidade e a diversidade biológica, permitindo a identificação de variações genéticas entre diferentes espécies e indivíduos. No caso de *S. liquefaciens* L211, os dados obtidos no sequenciamento revelaram que o tamanho do genoma é pouco maior do que a média da espécie, estimado em 5,3 Mb, indicando a existência de variações genômicas. Essas variações são comuns em bactérias da mesma espécie e são influenciadas pelo ganho e perda de genes acessórios, que têm funções importantes na adaptação das bactérias a diferentes nichos e estilos de vida (BOBAY; OCHMAN, 2017; ROULI et al., 2015; TOUCHON et al., 2009). Além disso, o sequenciamento do genoma de *S. liquefaciens* L211 também possibilitou a identificação de genes associados ao metabolismo de carboidratos, proteínas, aminoácidos, compostos aromáticos, entre outros e também genes relacionados com a fermentação. De acordo com Grimont e Grimont (2006), *S. liquefaciens* é capaz de utilizar diferentes açúcares como fonte de carbono, como sacarose, L-arabinose, maltitol, melibiose e sorbitol. Além disso, *S. liquefaciens* também é capaz de fermentar substratos como a sacarose, D-manitol, salicina, D-sorbitol, L-arabinose, maltose, D-xilose e trealose (RAFII, 2014). Ao avaliar o metabolismo de *S. liquefaciens* utilizando um kit comercial contendo 95 diferentes substratos como fonte de carbono, Schwendner e Schuerger (2018) demonstraram que a bactéria, cultivada a 30 °C sob pressão atmosférica, foi capaz de utilizar 96% das fontes de carboidratos e 80% das fontes de aminoácidos disponíveis. Estes resultados mostram a versatilidade metabólica de *S. liquefaciens*, que pode utilizar diferentes carboidratos, o que permite que a bactéria possa habitar diferentes nichos ecológicos, incluindo água, plantas, alimentos, animais e o homem.

A presença de nove profagos no genoma, identificada pela ferramenta PHASTER, pode conferir a *S. liquefaciens* L211 capacidade adaptativa a condições ambientais. Análises de Caneschi et al. (2019) identificaram 13 fagos no genoma de *S. liquefaciens* FG3, sendo 11 regiões intactas e duas regiões questionáveis, o que contribui com o diversificado repertório genético do isolado. As inserções de fagos no genoma têm função importante na diversidade

genética e variações entre linhagens bacterianas (FORTIER; SEKULOVIC, 2013). A presença de profagos no genoma bacteriano pode conferir à bactéria hospedeira genes que possibilitem a adaptação a novos habitats, a aquisição de resistência a antibióticos, ou ainda, permitir que a estirpe se torne patogênica (ARNDT et al., 2016).

A ferramenta web *IslandViewer* 4.0 identificou a presença de possíveis ilhas genômicas no genoma de *S. liquefaciens* L211. Ilhas genômicas são agrupamentos de genes, geralmente apresentando entre 10-200 kb, adquiridos por transferência horizontal de genes entre duas linhagens, flanqueadas por regiões repetidas, e são considerados importantes elementos na evolução, diversidade, adaptação, metabolismo, patogenicidade e resistência a antibióticos (DESVAUX et al., 2020; JUHAS et al., 2009). Nas ilhas genômicas do isolado de *S. liquefaciens* L211 foram identificadas diversas proteínas relacionadas a fagos como proteínas de cauda, capsídeo, integrases e holinas, o que pode ser resultado da presença de profagos integrados ao genoma da bactéria.

Ainda que os alinhamentos das sequências genômicas de *S. liquefaciens*, realizados pelos softwares BRIG e Mauve tenham revelado alto grau de conservação entre as mesmas, é possível notar variabilidade genética entre os indivíduos da espécie. As inserções de fagos no genoma são de grande importância para a diversidade do repertório genético entre os genomas de *S. liquefaciens*, o que é reforçado pela análise em conjunto dos resultados obtidos pelas ferramentas PHASTER, *IslandViewer* 4.0 e BRIG, mostrando a sobreposição entre os clusters identificados. Weise et al. (2014) fizeram observação semelhante sobre o genoma de *Serratia plymuthica* 4Rx13 ao analisarem os resultados de dois softwares, PHAST e *IslandViewer*, mostrando a ocorrência de sobreposição da região de inserção de fagos e das ilhas genômicas identificadas. Estas análises dos genomas de *S. liquefaciens* L211 e *S. plymuthica* 4Rx13 reforçam a importância dos fagos na variabilidade genética das espécies.

A presença de genes associados a biossíntese de metabólitos secundários como dois sideróforos, enterobactina e aerobactina, também indicam o potencial adaptativo de *S. liquefaciens* L211. Sideróforos são pequenas moléculas sintetizadas por microrganismos que atuam como quelantes do cátion  $Fe^{+3}$ , aumentando sua solubilidade no meio e disponibilizam o íon para captação e utilização pelos microrganismos ((Roth-Walter et al., 2014; Chen et al., 2023). O ferro é um elemento essencial para o metabolismo microbiano, sendo necessário para a respiração e síntese de RNA, por exemplo (CORNELIS, 2010). Em ambientes aeróbios o cátion  $Fe^{2+}$  é rapidamente oxidado a  $Fe^{3+}$  que, em pH neutro, forma compostos insolúveis (PAYNE; MEY; WYCKOFF, 2016). Em ambientes com baixa concentração de ferro, as bactérias utilizam sideróforos como estratégia para aumentar a disponibilidade e captação de

ferro (KRAMER; ÖZKAYA; KÜMMERLI, 2020). O leite de vaca, por exemplo, tem baixo teor de ferro, de aproximadamente 0,5 mg/L (PIETRZAK-FIEĆKO; KAMELSKA-SADOWSKA, 2020). Além disso, a presença de proteínas ligantes de ferro, como a lactoferrina, diminui ainda mais a disponibilidade de ferro (BROWN; LUKE, 2010). Portanto, a produção de sideróforos confere vantagens para os microrganismos se estabelecer no ambiente lácteo.

Genes de enterobactina e aerobactina foram identificados no genoma de *S. liquefaciens* FG3, isolada da flor de *Stachytarpheta glabra*, encontrada na região do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais, Brasil (CANESCHI et al., 2019). Segundo Caneschi et al. (2019), genes relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários ajudam as bactérias a sobreviverem em ambientes onde há competição com outros microrganismos. Embora a produção de sideróforos por *S. liquefaciens* L211 tenha sido confirmada em ensaio *in vitro*, o método usado não identifica a natureza química do sideróforo.

A estreita relação entre *S. liquefaciens* L211 e os demais isolados de *S. liquefaciens* foi confirmada pelos valores de ANI obtidos, sendo todos maiores que 97%. Resultados entre 95–96% são recomendados para considerar organismos procarióticos como pertencentes a uma mesma espécie (KIM et al., 2014; RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009). O valor de ANI é uma propriedade que retrata a semelhança entre genomas distintos (JAIN et al., 2018). O conteúdo G+C do DNA genômico é uma das características que também pode ser utilizada para descrições taxonômicas de microrganismo, indicando que organismos pertencem a espécies distintas caso a diferença de conteúdo G+C entre eles seja superior a 1% (MEIER-KOLTHOFF; KLENK; GÖKER, 2014). O fato das diferenças de conteúdo G+C entre *S. liquefaciens* L211 e os demais isolados ser inferior a 1% fortalece os dados obtidos ao se calcular os valores de ANI, confirmando que os nove genomas analisados são de organismos de uma mesma espécie. Os valores acima de 70% de dDDH reforçam ainda mais as conclusões obtidas por ANI e pela análise de diferença de conteúdo G+C. Além disso, os valores de ANI e dDDH também revelam que *S. liquefaciens* L211 é mais próxima de *S. liquefaciens* FDAARGOS 125, isolado de infecções nosocomiais, e mais distante de *S. liquefaciens* FG3, isolado de uma flor natural dos campos ferruginosos brasileiros.

A formação de dois clados na árvore filogenética mostra que *S. liquefaciens* L211 é mais próxima filogeneticamente dos isolados presentes no clado 1, onde se situa também, *S. liquefaciens* FDAARGOS 125, e mais distante dos isolados que compõem o clado 2, representado pelos isolados MT9, FG3 e FDAAROS 1081. Uma observação interessante é que *S. liquefaciens* L211, *S. liquefaciens* JL02 e *S. liquefaciens* S1, agrupados no mesmo clado na

árvore filogenética, foram isolados de amostras de alimentos, sendo L211 e JL02 isoladas de amostras de leite e S1 isolada de salada de verduras, conforme descrito na tabela 1.

As motilidades *swimming* e *swarming*, apresentadas por *S. liquefaciens* L211, estão associadas a presença de flagelos (LUCERO et al., 2020). Além do flagelo, as bactérias podem utilizar o pilus tipo IV para se deslocarem, realizando um tipo de motilidade conhecida como *twitching* (MAIER; WONG, 2015). Como pode ser observado, *S. liquefaciens* L211 também apresentou a motilidade do tipo *twitching*, o que demonstra que a bactéria possui diferentes estruturas de locomoção, permitindo, o escape de condições adversas e exploração novos ambientes em busca de melhores recursos. *Serratia marcescens* MG1, anteriormente classificada como *S. liquefaciens* MG1, também apresentou as motilidades citadas (EBERL; MOLIN; GIVSKOV, 1999; LABBATE et al., 2007). Possuir diferentes mecanismos de motilidades é extremamente vantajoso para as bactérias uma vez que estes modos de locomoção estão envolvidos em processos de adesão, formação de biofilmes, colonização e fuga de ambientes nocivos (MATTINGLY et al., 2018; OTTON et al., 2017).

A deterioração de produtos lácteos por microrganismos psicrotróficos, como *S. liquefaciens*, tem sido associada à secreção de enzimas termorresistentes capazes de hidrolisar os constituintes moleculares dos alimentos ocasionando em alterações sensoriais indesejáveis. A montagem e anotação do genoma de *S. liquefaciens* L211 revelou a presença de genes de proteases e poliuretase, com atividade de lipase cujas atividades podem degradar, respectivamente, as proteínas e os triglicerídeos dos alimentos. A atividade proteolítica de *S. liquefaciens* também foi verificada por Machado et al. (2016) em 23 isolados capazes de secretar metaloproteases resistentes ao calor que levam à deterioração e contribuem para a redução da vida de prateleira do leite processado termicamente. Além disso, os autores sequenciaram o gene da protease Ser2, que codifica a metaloprotease e observaram 100% de identidade entre as sequências de nucleotídeos do gene *ser2* entre os diferentes isolados de *S. liquefaciens*. Baglinière et al. (2017) relataram que a protease termoestável de *S. liquefaciens* levou a desestabilização do leite UHT devido à hidrólise das caseínas após 8 dias de armazenamento.

Os resultados da atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L211 corroboraram os resultados de Salgado et al. (2020), que avaliaram o potencial lipolítico de *S. liquefaciens* L135 em temperaturas variando de 4 a 37 °C. Os autores observaram que *S. liquefaciens* L135 produz uma lipase extracelular de, aproximadamente, 65 kDa e que a atividade lipolítica aumenta em função da temperatura, sendo a atividade ótima observada a 30 °C. A hidrólise de triacilgliceróis dos alimentos por enzimas lipolíticas libera ácidos graxos de cadeia curta que serão os

responsáveis por alterações nas propriedades sensoriais dos alimentos, como rancidez, sabor amargo e adstringente, o que torna o produto inadequado para consumo (CHEN et al., 2003; DEETH, 2006; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997).

O genoma de *S. liquefaciens* L211 apresenta um gene que codifica uma poliuretase e estes resultados também estão de acordo com os observados por Salgado et al. (2021), que demonstraram que a lipase termorresistente de *S. liquefaciens* L135 é uma poliuretase com atividade ótima a 30 °C. A atividade residual dessa enzima de, aproximadamente, 21% a 4 °C foi mantida, sendo capaz de deteriorar alimentos armazenados sob temperatura de refrigeração.

Estudos indicam que enzimas com atividade hidrolítica, como proteases, lipases, ureases e esterases, podem degradar poliuretano, e assim serem classificadas como poliuretases (CANTO; THOMPSON; NETZ, 2019; JAISWAL; SHARMA; SHUKLA, 2020). Impranil™, um poliuretano sintetizado a partir de poliéster de polihexano/neopentil adipato e diisocianato de hexametileno, foi utilizado como substrato para a avaliar a atividade de poliuretase de *S. liquefaciens* L211 (MAGNIN et al., 2020). O potencial de hidrólise de poliuretanos por parte de *S. liquefaciens* L211 é uma questão relevante, já que esses polímeros plásticos são amplamente utilizados na fabricação de uma série de materiais, tais como adesivos, isolantes térmicos, colchões, tintas, bem como em produtos biomédicos como implantes ósseos e cartilagosos e *stents* para o tratamento de doenças cardiovasculares (CANTO; THOMPSON; NETZ, 2019; STERN; HOWARD, 2000). No entanto, a utilização desses materiais também gera graves problemas de contaminação ambiental. Desta forma, estudos sobre a capacidade de hidrólise de poliuretanos por poliuretases microbianas são importantes uma vez que estas enzimas podem ser uma possível solução para esse problema ambiental.

## 5. Conclusão

O sequenciamento do genoma de *S. liquefaciens* L211 mostra a versatilidade e a capacidade adaptativa da bactéria a diferentes situações e é de grande importância para entender a associação deste microrganismo com a deterioração de produtos alimentícios. O presente estudo mostrou que *S. liquefaciens* apresenta características genéticas bastante conservadas, contudo, algumas diferenças podem ser observadas entre os membros da espécie o que permite que a bactéria possa ser encontrada em diferentes habitats. Também foi mostrado que *S. liquefaciens* L211 possui genes que codificam enzimas capazes de levar à deterioração de alimentos. Relacionar análises genômicas com o proteoma *S. liquefaciens* pode ser uma abordagem útil tanto para entender os mecanismos de deterioração de alimentos utilizados por estes microrganismos quanto para buscar estratégias que visem controlar os danos causados por esta bactéria.

## 6. Referências bibliográficas

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: Proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

ALIKHAN, N. F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.

ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W16–W21, 2016.

BAGLINIÈRE, F. et al. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 38–45, 2017.

BEGREM, S. et al. Genomic diversity of *Serratia proteamaculans* and *Serratia liquefaciens* predominant in seafood products and spoilage potential analyses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 354, 2021.

BERTELLI, C. et al. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W30–W35, 2017.

BLIN, K. et al. AntiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W29–W35, 2021.

BOBAY, L. M.; OCHMAN, H. The evolution of bacterial genome architecture. **Frontiers in Genetics**. v.8, n. 72, p. 1-6, 2017.

BROWN, A. G.; LUKE, R. K. J. Siderophore production and utilization by milk spoilage *Pseudomonas* species. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1355–1363, 2010.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5308–5319, 2007.

CANESCHI, W. L. et al. *Serratia liquefaciens* FG3 isolated from a metallophyte plant sheds light on the evolution and mechanisms of adaptive traits in extreme environments. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

CANTO, V. P. DO; THOMPSON, C. E.; NETZ, P. A. Polyurethanases: Three-dimensional structures and molecular dynamics simulations of enzymes that degrade polyurethane. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 89, p. 82–95, 2019.

CASALTA, E. et al. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 243–251, 2009.

CEZAIIRLIYAN, B.; AUSUBEL, F. M. Investment in secreted enzymes during nutrient-limited growth is utility dependent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 37, p. E7796–E7802, 2017.

CHEN, J. et al. Role of siderophore in *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation and spoilage potential function. **Food Microbiology**, v. 109, p. 104151, 2023.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p. 255-275, 2003.

CHEN, S.; BLOM, J.; WALKER, E. D. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, 2017.

CHUN, J. et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018.

CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1637-1645, 2010.

DARLING, A. C. E. et al. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, 2004.

DARLING, A. E.; MIKLÓS, I.; RAGAN, M. A. Dynamics of genome rearrangement in bacterial populations. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 7, 2008.

DE COSTER, W. et al. NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. **Bioinformatics**, v. 34, n. 15, p. 2666–2669, 2018.

DE SENA BRANDINE, G.; SMITH, A. D. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. **F1000Research**, v. 8, p. 1874, 2019.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 555-562, 2006.

DESVAUX, M. et al. Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-35, 2020.

EBERL, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v. 11, p. 1703-1712, 1999.

FEKRIRAD, Z.; KASHEF, N.; AREFIAN, E. Photodynamic inactivation diminishes quorum sensing-mediated virulence factor production and biofilm formation of *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, 2019.

FORTIER, L. C.; SEKULOVIC, O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 354–365, 2013.

FOUGY, L. et al. Draft genome sequence of *Serratia proteamaculans* MFPA44A14-05, a model organism for the study of meat and seafood spoilage. **Genome Announcements**, v. 5, n. 23, 2017.

GARCÍA, C. et al. Microbial populations and volatile compounds in the “bone taint” spoilage of dry cured ham. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 61-66, 2000..

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The genus *Serratia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes proteobacteria: gamma subclass, vol 6. Springer, New York, pp 219–244.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; IRINO, K. Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens sensu stricto*, *Serratia proteamaculan*, and *Serratia grimesii* sp. nov. **Current Microbiology**, v, 7, p. 69-74, 1982.

GUSTAVSSON, J; CEDERBERG, C.; SONESSON, U. **Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention; Study Conducted for the International Congress Save Food! at Interpack 2011, [16–17 May], Düsseldorf, Germany** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2011.

HALEY, C. L. et al. Mucin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by significantly enhancing twitching motility. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 155–166, 2014.

JAIN, C. et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

JAISWAL, S.; SHARMA, B.; SHUKLA, P. Integrated approaches in microbial degradation of plastics. **Environmental Technology and Innovation**. v. 17, p. 1-13, 2020.

JUHAS, M. et al. Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 376-393, 2009.

JUPATANAKUL, N. et al. *Serratia marcescens* secretes proteases and chitinases with larvicidal activity against *Anopheles dirus*. **Acta Tropica**, v. 212, 2020.

KHALIFA, A. First isolation and characterization of *Serratia liquefaciens* associated with rot disease of *Malus domestica* (apple) fruit and its inhibition by *Origanum vulgare* (oregano) oil. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, 2022.

KIM, M. et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 346–351, 2014.

KOLMOGOROV, M. et al. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 540–546, 2019.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 152-163, 2020.

LABBATE, M. et al. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 7, p. 2702–2711, 2007.

LÁZARO-DÍEZ, M. et al. Whole-genome sequence of *Serratia liquefaciens* HUMV-21, a cytotoxic, quorum-sensing, and biofilm-producing clinical isolate. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, 2015.

LEFORT, V.; DESPER, R.; GASCUEL, O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 10, p. 2798–2800, 2015.

LUCERO, C. T. et al. Motility and biofilm production involved in the interaction of phosphate solubilizing endophytic strains with peanut, maize and soybean plants. **Rhizosphere**, v. 15, 2020.

LUO, H. Z. et al. Inhibitory effect of norharmane on *Serratia marcescens* NJ01 quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation. **Biofouling**, v. 37, n. 2, p. 145–160, 2021.

MACHADO, S. G. et al. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842–M1849, 2015.

MACHADO, S. G. et al. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 65–71, 2016.

MAGNIN, A. et al. Evaluation of biological degradation of polyurethanes. **Biotechnology Advances**, v. 39, 2020.

MAIER, B.; WONG, G. C. L. How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 775-788, 2015.

MATTINGLY, A. E. et al. Assessing travel conditions: Environmental and host influences on bacterial surface motility. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 11, 2018.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. et al. TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D801–D807, 2022.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, H. P.; GÖKER, M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 352–356, 2014.

NICHOLSON, W. L. et al. Complete genome sequence of *Serratia liquefaciens* strain ATCC 27592. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, 2013.

NIEVAS, F. et al. Detection, characterization, and biological effect of quorum-sensing signaling molecules in Peanut-nodulating bradyrhizobia. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2851–2873, mar. 2012.

OCHIENG, J. B. et al. *Serratia marcescens* is injurious to intestinal epithelial cells. **Gut Microbes**, v. 5, n. 6, p. 729–736, 2015.

OTTON, L. M. et al. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 5, p. 677–682, 2017.

OVERBEEK, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, 2014.

PAYNE, S. M.; MEY, A. R.; WYCKOFF, E. E. *Vibrio* iron transport: Evolutionary adaptation to life in multiple environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 69–90, 2016.

PIETRZAK-FIEĆKO, R.; KAMELSKA-SADOWSKA, A. M. The comparison of nutritional value of human milk with other mammals' milk. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.

PRADO, G. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 1, 2022.

RAFII, F. *Serratia*. In: **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**. Elsevier Inc., 2014. p. 371–375.

RAHIMI, T. et al. Genome annotation and comparative genomic analysis of *Bacillus subtilis* MJ01, a new bio-degradation strain isolated from oil-contaminated soil. **Functional and Integrative Genomics**, v. 18, n. 5, p. 533–543, 2018.

RENNEBERG, R. Enzymes. In: **Biotechnology for Beginners**. Elsevier Inc., 2023. p. 35–68.

RICHTER, M. et al. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929–931, 2016.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 2009.

ROULI, L. et al. The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. **New Microbes and New Infections**, v. 7, p. 72–85, 2015.

SALGADO, C. A. et al. Identification and characterization of a polyurethanase with lipase activity from *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw cow's milk. **Food Chemistry**, v. 337, 2021.

SALGADO, C. A.; BAGLINIÈRE, F.; VANETTI, M. C. D. Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk. **LWT Food Science and Technology**, v. 126, 2020.

SCHWENDNER, P.; SCHUERGER, A. C. Metabolic fingerprints of *Serratia liquefaciens* under simulated Martian conditions using Biolog GN2 microarrays. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35–41, 1997.

STEIN, M. et al. Complete genome sequence of tetracycline-resistant *Serratia liquefaciens* S1, isolated from mixed greens, obtained using Illumina MiSeq and Oxford Nanopore MinION Sequencing. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 19, 2020.

STERN, R. V; HOWARD, G. T. The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, n. 2, p. 163–168, 2000.

TOUCHON, M. et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 1, 2009.

WANG, G. YU et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and *in situ*. **Food Microbiology**, v. 63, p. 139–146, 2017.

WEISE, T. et al. VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. **FEMS Microbiology Letters**, v. 352, p. 45-53, 2014.

WILLIAMS, D. J. et al. The genus *Serratia* revisited by genomics. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022.

YAZGAN, H.; OZOGUL, Y.; KULEY, E. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 306, 2019.

ZAGDOUN, M. et al. Large microbiota survey reveals how the microbial ecology of cooked ham is shaped by different processing steps. **Food Microbiology**, v. 91, 2020.

**CAPÍTULO 2 – Inibição das atividades proteolítica e lipolítica de *Serratia liquefaciens* por nisina**

## 1. Introdução

O leite recém ordenhado apresenta baixa população de espécies microbianas (BERHANU et al., 2021). Entretanto, após a ordenha, o leite é exposto a microrganismos contaminantes provenientes de diversas fontes como a superfície externa do úbere, equipamentos de ordenha mal higienizados, mãos de manipuladores, entre outras (MACHADO et al., 2017). Ao terem acesso ao leite, estes microrganismos se multiplicam e, alguns deles, sintetizam enzimas capazes de degradar proteínas e lipídeos resultando na deterioração da matéria-prima, bem como dos derivados lácteos (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; OLIVEIRA et al., 2015).

A indústria de laticínios utiliza principalmente, a refrigeração e o tratamento térmico para garantir a qualidade e segurança do leite (MACHADO et al., 2017). A refrigeração do leite cru é efetiva para controlar o crescimento de microrganismos mesófilos, mas, por outro lado, favorece o desenvolvimento de psicrotróficos (BEALES, 2004; COLANTUONO et al., 2020). Além de conseguirem se multiplicar em baixas temperaturas, alguns microrganismos psicrotróficos são capazes de sintetizar proteases e lipases extracelulares termorresistentes (BAGLINIÈRE et al., 2017; MARTINS et al., 2015; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Apesar dos tratamentos térmicos, como a pasteurização e Ultra Alta Temperatura (UAT), inativarem a microbiota psicrotrófica, as enzimas termorresistentes mantêm atividade residual e podem causar problemas como gelificação do leite, sabor amargo, rancidez, entre outros (MACHADO et al., 2017; MARTINS et al., 2015; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; YANG et al., 2020).

As bactérias psicrotróficas mais comumente encontradas no leite pertencem aos gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (MACHADO et al., 2017; MARTINS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2015; YUAN et al., 2017). *Pseudomonas* spp., principalmente as espécies do grupo *Pseudomonas fluorescens*, são apontadas como as principais espécies psicrotróficas produtoras de enzimas termorresistentes deterioradoras de leite cru refrigerado (DOGAN; BOOR, 2003; MACHADO et al., 2015; MARCHAND et al., 2009). A presença de *Serratia* em ambientes de processamento e amostras de leite refrigerado também tem sido associada com a deterioração do leite e produtos lácteos (ABDOU, 2003; CLETO et al., 2012; DECIMO et al., 2014; MACHADO et al., 2015). Entre as bactérias do gênero *Serratia*, a espécie *Serratia liquefaciens* foi isolada de amostras de leite refrigerado (JUVEN; GORDIN; LAUFER, 1979; LAFARGE et al., 2004; MACHADO et al., 2015; TEH et al., 2011) e o potencial deteriorador desta espécie

pela produção de proteases e lipases termorresistentes investigado (BAGLINIÈRE et al., 2017; SALGADO et al., 2020).

*S. liquefaciens* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, que pertencem à família *Yersiniaceae* (ADEOLU et al., 2016). Esta espécie sintetiza duas metaloproteases da família das serralisinas, codificadas pelos genes *ser1* e *ser2*, sendo a termorresistência uma característica associada à protease Ser2 (KAIBARA et al., 2012; MACHADO et al., 2016). Além disso, *S. liquefaciens* é capaz de degradar triacilgliceróis presentes no leite devido a secreção de lipase termoestável (SALGADO; BAGLINIÈRE; VANETTI, 2020). Estas enzimas apresentam alto potencial de deterioração do leite. Entretanto, poucas informações sobre essas enzimas estão disponíveis na literatura.

A dificuldade de inativar proteases e lipases termorresistentes durante o processamento sem alterar as propriedades sensoriais dos alimentos tem sido um obstáculo para a garantia da qualidade dos mesmos pela indústria. Assim, são necessárias pesquisas para encontrar alternativas eficazes capazes de inibir a atividade destas enzimas. Estudos prévios para a realização deste trabalho demonstraram que a bacteriocina nisina apresenta um efeito inibitório sobre as atividades proteolítica e lipolítica de *S. liquefaciens*.

Nisina é um peptídeo catiônico que possui 34 resíduos de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica e amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas (KHAN; OH, 2016). Devido à carga líquida positiva, nisina se liga preferencialmente em paredes celulares de bactérias que contenham altos teores de lipídeos aniônicos, característica de bactérias Gram-positivas. Em bactérias Gram-negativas, a membrana externa presente atua como uma barreira física, o que dificulta o acesso da nisina à parede celular e impede sua ação sobre o lipídeo II, um precursor do peptideoglicano e sítio ativo da bacteriocina (BREUKINK; DE KRUIJFF, 2006; HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000; VUKOMANOVIĆ et al., 2017). Entretanto, a ação de nisina contra bactérias Gram-negativas pode ser observada quando a bacteriocina foi associada com outros tratamentos antimicrobianos capazes de desestabilizar a membrana externa bacteriana, como etilenodiamino tetra-acético, conhecido como EDTA (PRUDÊNCIO et al., 2016; UKUKU; FETT, 2004), ultrassom (COSTELLO et al., 2021; FREITAS et al., 2019), processamento em alta pressão (BLACK; KELLY; FITZGERALD, 2005; ONER, 2020), entre outros, indicando que nisina precisa atravessar a membrana externa para exercer atividade bactericida (BOZIARIS; ADAMS, 1999; HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000; WU et al., 2023). Uma vez que tenha acesso à membrana celular bacteriana, nisina leva à formação de poros, com consequente efluxo de material intracelular e dissipação da força próton motora, resultando na morte do microrganismo (BREUKINK; DE

KRUIJFF, 2006; PRUDÊNCIO; DOS SANTOS; VANETTI, 2015; ZACHAROF; LOVITT, 2012).

Descoberta em 1928, nisina é a bacteriocina mais estudada, tendo seu uso permitido como conservante de alimentos desde 1950, podendo ser utilizada em queijos, saladas, sopas enlatadas, entre outros (KHAN; OH, 2016). Em 1988, a *Food and Drug Administration* (FDA) concedeu o status GRAS (Geralmente Reconhecida como Segura) à nisina por ter ação antimicrobiana em baixas concentrações, não apresentar toxicidade contra células eucarióticas, ser hidrolisada por enzimas digestivas e não alterar as propriedades sensoriais dos produtos alimentícios (BALCIUNAS et al., 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; KRIVOROTOVA et al., 2016).

Considerando as evidências do efeito inibidor da atividade enzimática por nisina, decidiu-se investigar os efeitos dessa bacteriocina sobre o crescimento e sobre a atividade enzimática de *S. liquefaciens* L211 em leite.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Isolado bacteriano**

*S. liquefaciens* L211 foi isolado por Machado et al. (2015) de amostra de leite cru coletada de fazenda localizada em um raio de 50 km de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Entre os isolados obtidos por Machado et al. (2015), *S. liquefaciens* L211 foi selecionado por apresentar alta atividade proteolítica utilizando azocaseína (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) como substrato para a reação enzimática. Antes dos ensaios, um pré-inóculo foi feito a partir da suspensão de células em glicerol (20% v/v) armazenada à -80 °C, transferindo-se uma alíquota para tubos de ensaio contendo caldo Luria Bertani (LB, Neogen, Lansing, Michigan, Estados Unidos), que foi então incubada a 30 °C por 24 horas.

### **2.2. Preparo e atividade da solução estoque de nisina**

A solução estoque de nisina foi preparada diluindo-se 1 g de Nisaplin® (2,5% p/p de nisina, Nisaplin®, Danisco, Beaminster, Dorset, Reino Unido) em tampão fosfato de sódio (PBS, 5 mM, pH 2,0). A atividade antimicrobiana da solução estoque de nisina foi determinada pelo método de difusão em ágar utilizando *Lactococcus lactis* ATCC 19435 como microrganismo indicador (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976) e quantificada pelo método de difusão crítica (HOOVER; HARLANDER, 1993), sendo a concentração expressa em unidades arbitrárias (UA/mL).

### **2.3. Condições de cultivo**

Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi transferida para microtubos e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina 0,85% (p/v). Em seguida foram efetuadas diluições seriadas de 100 vezes (1:100). Alíquotas de 0,1 mL das diluições 1:100 foram inoculadas em 10 mL de leite desnatado reconstituído a 10% (p/v, LDR), adicionado de 400 UA/mL de nisina. Nisina foi substituída por PBS (5mM, pH 2,0) no tratamento controle. A população bacteriana das amostras no tempo

inicial foi de aproximadamente  $10^5$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As amostras foram incubadas a 30 °C por 48 horas.

Plaqueamentos, utilizando o método de microgotas, foram realizados em ágar de contagem padrão (PCA, Neogen, Lansing, Michigan, Estados Unidos) para determinar o número de células viáveis nos intervalos de tempo 0, 24 e 48 horas. Nos mesmos intervalos de tempo, foram coletadas alíquotas de 0,5 mL para análise da atividade proteolítica e lipolítica. As alíquotas coletadas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos limpos e armazenados a -20 °C até a análise.

#### **2.4. Quantificação da atividade proteolítica**

Na reação para quantificar a atividade proteolítica utilizou-se azocaseína (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) como substrato, conforme Dufour et al. (2008), com modificações. A solução estoque de azocaseína 2% (p/v) foi preparada diluindo-se o substrato em solução de Tris-HCL 100 mM, pH 8,0. Alíquotas de 50 µL de cada um dos sobrenadantes livres de células, referentes aos tempos 0, 24 e 48 horas, coletados anteriormente, foram adicionados a microtubos contendo 250 µL de azocaseína 2% (p/v). Em seguida, as misturas foram aquecidas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético 20% (p/v, TCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g e a absorbância a 366 nm foi determinada. Amostras coletadas imediatamente após o preparo da mistura de reação contendo ou não nisina, foram utilizadas como branco para as reações.

#### **2.5. Quantificação da atividade lipolítica**

A atividade lipolítica foi quantificada utilizando *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) como substrato, conforme Salgado et al. (2020). Primeiramente, foram preparadas duas soluções, A e B. A solução A, constituída de *p*-NPP 0,3% (m/v) diluído em 2-propanol e a solução B, constituída de desoxicolato de sódio 0,2% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v) dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0. A

solução do substrato foi preparada a partir da mistura das soluções sendo 10% da solução A e 90% da solução B. Em seguida, 100 µL dos sobrenadante coletados anteriormente (item 2.3) foram adicionados a 900 µL da solução do substrato e incubadas por 1 hora a 30 °C. A reação enzimática foi finalizada pela adição de 0,5 mL de 1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e a absorbância a 410 nm foi determinada.

## 2.6. Avaliação das atividades proteolítica e lipolítica em ágar

Microtubo contendo 1 mL do pré-inóculo foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o *pellet* foi lavado duas vezes com solução salina 0,85% (p/v). As células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,85% (p/v). Para avaliar a atividade proteolítica em ágar, gotas de 5 µL da suspensão de células foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo PCA suplementado com 1% de LDR (v/v), respectivamente, adicionados de 400 UA/mL de nisina. A atividade lipolítica adicionando nisina, em concentrações de 200 UA/mL e 400 UA/mL, em placas contendo ágar tributirina. Uma alíquota de 5 µL da suspensão de células foram inoculadas no centro das placas. As placas foram incubadas por 24 horas a 30 °C. O mesmo volume da solução de nisina adicionados nas placas foi substituído por solução tampão fosfato-salino (Phosphate buffered saline, PBS) (5 mM, pH 2,0) nas placas controle. Após a incubação, foi verificada a formação de halo claro ao redor das colônias.

## 2.7. Extração e quantificação de RNA

*S. liquefaciens* L211 foi cultivada em frascos Erlenmeyer contendo 10 mL de LDR na presença e na ausência de 400 UA/mL de nisina, a 30 °C por 48 horas, e alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos 0, 24 e 48 horas. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 6 °C e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas três vezes em 1 mL de tampão PBS (pH 7,2) suplementado com EDTA 0,5 mM e dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos a 6 °C. Logo após, as células foram ressuspensas em 1 mL de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Germantown, Maryland, Estados Unidos), agitadas por 30 segundos em vórtex e deixadas em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 300 µL de clorofórmio gelado, seguido de agitação

vigorosa por 15 segundos e novamente foram deixadas em repouso por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a fase translúcida superior foi transferida para microtubos limpos, 500 µL de isopropanol gelado foram adicionados e a mistura foi homogeneizada por inversão completa do reagente. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% gelado foi adicionado. A amostra foi homogeneizada delicadamente por inversão do tubo e, logo após, centrifugada a 7.500 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi deixado secar ao ar para evaporação do etanol. Posteriormente, o RNA foi ressuspendido em 30 µL de água Milli-Q® - DEPC e a concentração de RNA total foi estimada em espectrofotômetro Nanodrop™ 2000C Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Hudson, Nova Iorque, Estados Unidos). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese, aplicando-se 1 µL da amostra de RNA extraído em gel de agarose 0,8% (p/v). A amostra foi congelada a -80 °C para posterior análise.

## **2.8. Purificação do RNA e síntese de cDNA**

Um total de 1 µg de RNA foi purificado com RQ1 RNase-free DNase (Promega Madison, Wisconsin, Estados Unidos), utilizando 2 µL da enzima RQ1 RNase-free DNase, e os demais passos foram feitos seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com o kit ImProm-II Reverse Transcription (Promega Madison, Wisconsin, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fornecedor.

## **2.9. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)**

O genoma de *S. liquefaciens* L211 foi empregado como modelo para desenhar oligonucleotídeos específicos para os genes que codificam as proteases, *ser1* e *ser2*, e a poliuretase, *lipA* (Tabela 1), utilizando a plataforma *GenScript*. O *software* Oligo Explorer foi utilizado para avaliar a formação de dímeros e auto-anelamento e a especificidade dos oligonucleotídeos foi analisada por PCR eletrônico. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno 16S (ZHOU et al., 2011) . As reações de RT-qPCR foram

realizadas com Sybr Green I Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) em placas de 48 poços em um StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, Califórnia, Estados Unidos). As etapas da ciclagem térmica foram: primeiramente a etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos seguidas de 40 ciclos de etapa de desnaturação a 95 °C por 30 segundos e etapa de anelamento/alongamento a 60 °C por 1 minuto. Para cada oligonucleotídeo utilizado, foram feitas curvas padrão com diluições seriadas do cDNA e a eficiência da amplificação foi calculada pela fórmula  $E = (10^{(1/-slope)} - 1) \times 100$ . A quantidade relativa (Rq) de cada amostra para cada gene foi determinada utilizando as respectivas curvas padrão (MENDES et al., 2013).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para o ensaio de RT-qPCR

Gene alvo	Primer foward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Referência
<i>ser1</i>	GCGTAAGCCTGGGTATCGT	AATTCAGCGCGGAACAGCAG	Este trabalho
<i>ser2</i>	TGCCATGTATGCCTCCCGTT	AACCAGCGCCATATCGACCA	Este trabalho
<i>lipA</i>	CGGTGGCATCACTCTGGCTA	CGGAATCCTTGGCGGTCAGA	Este trabalho
<i>16S</i>	CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA	CCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA	Zhou et al., 2011

## 2.10. Análises estatísticas

O *software* GraphPad Prism 7.0 foi utilizado para todas as análises estatísticas e construção dos gráficos. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo método de comparações múltiplas de Bonferroni. Os valores  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) foram considerados estatisticamente significativos. Todos os experimentos foram realizados em três repetições biológicas independentes.

### 3. Resultados

O efeito de nisina sobre o crescimento de *S. liquefaciens* L211 em LDR foi avaliado nos tempos de 24 e 48 horas. Como observado na figura 1, 400 UA/mL de nisina não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *S. liquefaciens* L211 em leite no período de até 48 horas.

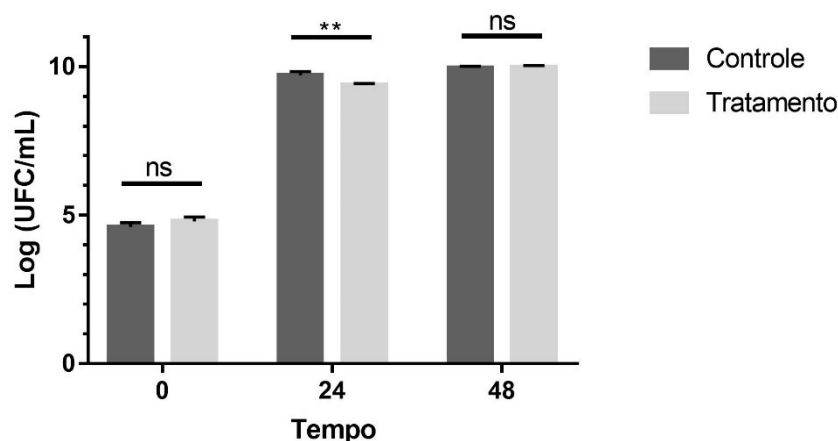


Figura 1. Crescimento de *S. liquefaciens* L211 em leite (■) e em leite adicionado de 400 UA/mL de nisina (▒), expresso em logaritmo do número de unidades formadoras de colônias (Log UFC/mL). A população inicial de *S. liquefaciens* no leite reconstituído a 10 % (volume final) foi de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL. Os resultados representam a média  $\pm$  DP de três réplicas biológicas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via. \*\* $p < 0,005$  e ns (não significativo,  $p > 0,05$ ).

Apesar de nisina não apresentar efeito inibitório sobre o crescimento de *S. liquefaciens* L211, as atividades enzimáticas da bactéria foram fortemente afetadas pela presença da bacteriocina no leite. Como pode ser observado na figura 2a, a atividade proteolítica de *S. liquefaciens* L211, quantificada utilizando azocaseína como substrato, foi inibida em, aproximadamente, 87% e 77% na amostra de leite adicionado de nisina nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente.

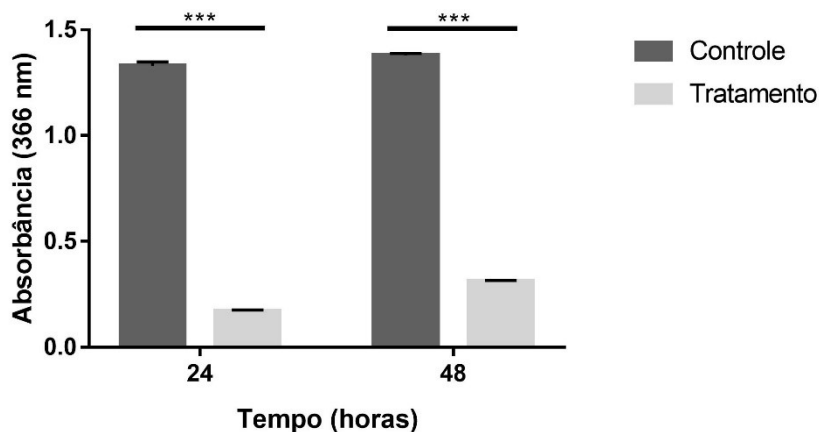


Figura 2. Atividade proteolítica de *S. liquefaciens* L211 em leite sem e com a adição de nisina. A atividade proteolítica de *S. liquefaciens* L211 foi quantificada por leitura de absorbância a 366 nm utilizando azocaseína como substrato. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via. \*\*\* $p < 0,001$  e ns (não significativo,  $p > 0,05$ ).

Do mesmo modo, a atividade lipolítica do isolado L211 foi avaliada nos tempos de 24 e 48 horas em amostras de leite adicionadas de 400 UA/mL de nisina e, em amostras controle, sem a adição do peptídeo antimicrobiano. Os resultados mostraram que a atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L211 foi inibida em 100% em 24 horas de cultivo (Figura 3). Entretanto, no tempo de 48 horas, não foi observada diferença estatística entre a atividade lipolítica da amostra controle e da amostra adicionada de nisina (400 UA/mL). No tratamento controle, onde o tampão PBS foi usado em substituição à nisina, a atividade lipolítica reduziu com o aumento do período de incubação de 24 para 48 horas (Figura 3). A atividade lipolítica da amostra controle do tempo de 48 horas representa 35,78% da atividade do tempo de 24 horas.

A atividade proteolítica também foi avaliada em placa contendo ágar PCA adicionada de 1% de LDR, inoculada com *S. liquefaciens* L211. Na placa controle, em que não foi adicionada nisina, observou-se um halo claro ao redor da colônia, indicando a presença de atividade proteolítica (Figura 4a). No entanto, quando 400 UA/mL de nisina foram adicionados ao meio de cultivo, não foi possível observar a formação de halo ao redor da colônia (Figura 4b). Isso confirma a inibição da atividade proteolítica de *S. liquefaciens* L211 pela presença de nisina no meio de cultivo.

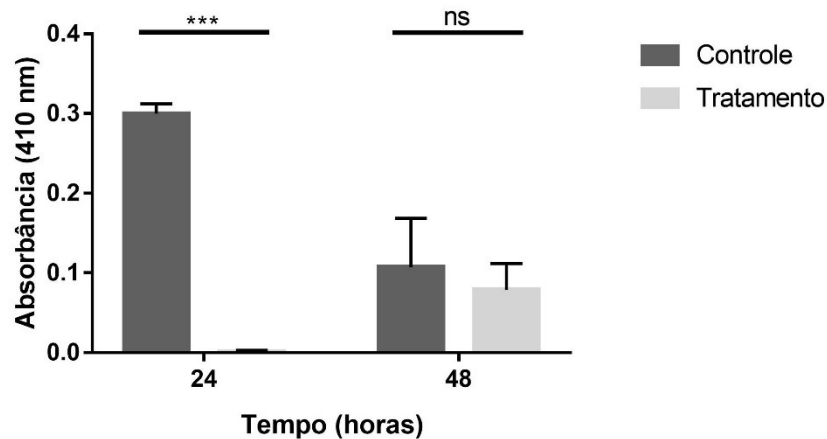


Figura 3. Atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L211 em leite sem e com a adição de nisina. A atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L211 foi quantificada por leitura de absorbância a 410 nm utilizando *p*-nitrofenil palmitato como substrato. ■ amostra controle, sem a adição de nisina, ■ amostra adicionada de 400 UA/mL de nisina. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via. \*\*\* $p < 0,001$  e ns (não significativo,  $p > 0,05$ ).

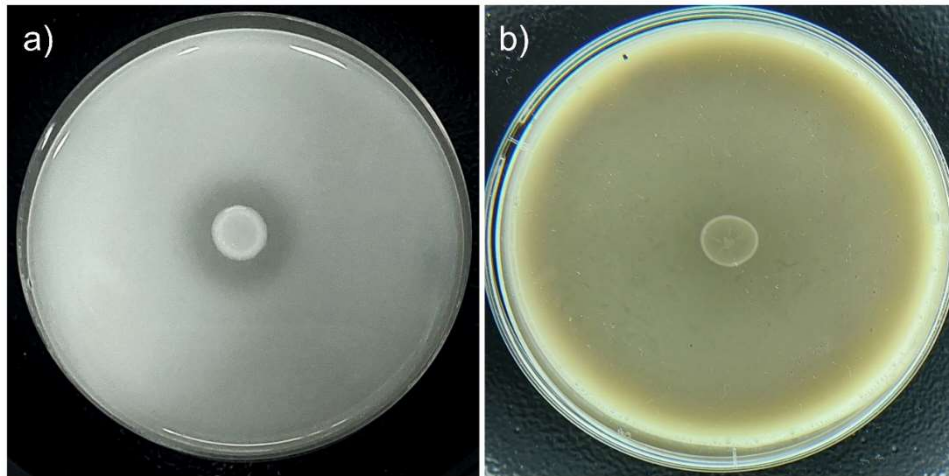


Figura 4. Atividade proteolítica de *S. liquefaciens* L211 em ágar leite sem e com a adição de nisina. a) Ágar PCA adicionado de 1% de leite desnatado reconstituído (10% p/v) inoculado com *S. liquefaciens* com presença de halo claro ao redor da colônia, indicativo de atividade proteolítica da bactéria. b) Ágar PCA adicionado de 1% de leite desnatado reconstituído e de nisina (400 UA/mL). A diferença de coloração dos meios é devido à cor marrom-avermelhada da solução de nisina, adicionada ao meio na imagem b.

Em placas contendo ágar tributirina inoculadas com *S. liquefaciens* L211 é possível observar a hidrólise da tributirina pela formação de halo ao redor da colônia (Figura 5a). Ao adicionar 200 UA/mL de nisina no meio (Figura 5b), não há a formação de halo de hidrólise ao

redor da colônia, o que demonstra que a atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L211 foi inibida. Entretanto, em placas de ágar tributirina com 400 UA/mL de nisina não foi observado o crescimento de *S. liquefaciens* L211 (Figura 5c).

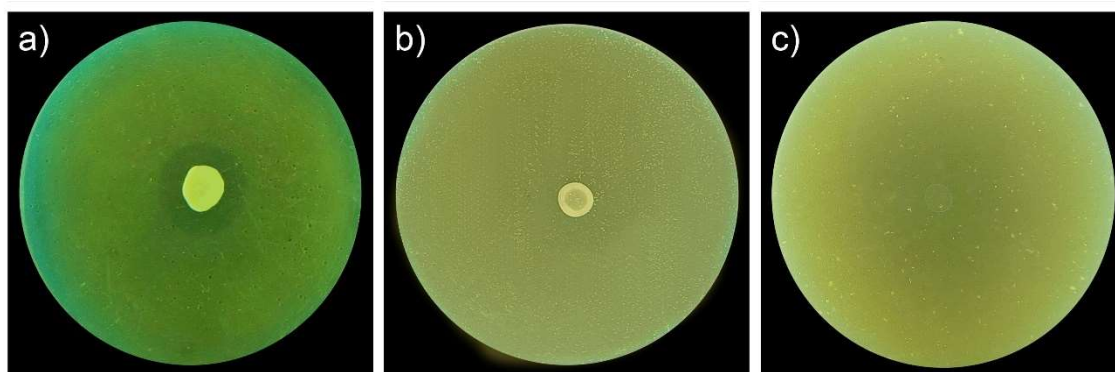


Figura 5. Atividade lipolítica de *S. liquefaciens* em ágar tributirina. a) Placa contendo ágar tributirina inoculado com *S. liquefaciens* de L211. O halo observado ao redor da colônia indica a hidrólise enzimática da tributirina decorrente da atividade lipolítica de *S. liquefaciens* L211. b) Placa contendo ágar tributirina adicionado de 200 UA/mL de nisina. c) Placa de ágar tributirina adicionado de 400 UA/mL de nisina.

A expressão relativa dos genes *ser1* (Figura 6a) e *ser2* (Figura 6b), codificadores de proteases e *lipA* (Figura 7), que codifica a lipase de *S. liquefaciens* L211 foi avaliada por RT-qPCR para verificar se a inibição da atividade das proteases e lipase de *S. liquefaciens* L211 por nisina ocorre a nível transcricional. A adição de 400 UA/mL de nisina no LDR 10% reduziu os níveis de expressão dos genes das proteases *Ser1* e *Ser2* de *S. liquefaciens* L11 no período de 24 horas, em comparação com as expressões desses genes no tratamento controle. A expressão gênica de *ser1* foi mais inibida (Figura 6a) do que *ser2* (Figura 6b) no período de 24 horas. A expressão de *ser1* e *ser2* reduziu em torno de 72% e 31%, respectivamente, quando *S. liquefaciens* L211 foi cultivada em LDR 10% adicionado de nisina por 24 horas. A expressão dos genes *ser1* e *ser2* é substancialmente reduzida com o aumento do período de incubação para 48 horas, no entanto, não foi observada diferença estatística.

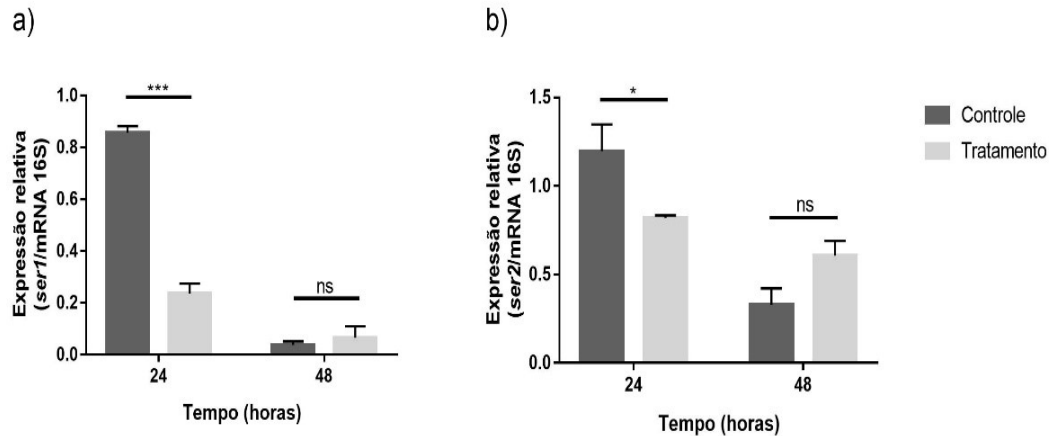


Figura 6. Expressão relativa dos genes *ser1* e *ser2* que codificam proteases de *S. liquefaciens* L211 em leite adicionado de nisina a) Expressão relativa do gene que codifica a protease Ser1. b) Expressão relativa do gene que codifica a protease Ser2. ■ amostra controle, sem a adição de nisina, ■ amostra adicionada de nisina (400 UA/mL). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$  e ns (não significativo,  $p > 0,05$ ).

A presença de 400 UA/mL de nisina no leite também inibiu cerca de 33% da expressão relativa do gene *lipA* no tempo de 24 horas (Figura 7). Entretanto, como pode ser observado na figura 7, não houve diferença significativa na expressão do gene da lipase, no tempo de 48 horas de incubação, na amostra adicionada de nisina.

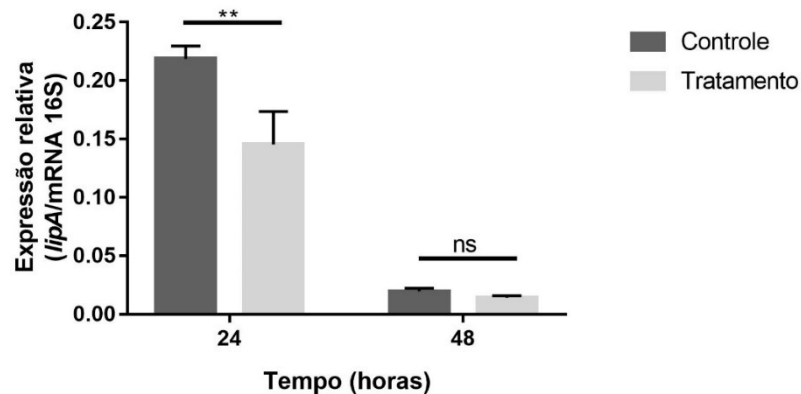


Figura 7. Análise da expressão relativa do gene *lipA* de *S. liquefaciens* L211 cultivada em leite adicionado de nisina. ■ amostra controle, sem a adição de nisina, ■ amostra adicionada de nisina (400 UA/mL). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$  e ns (não significativo,  $p > 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A eficácia da nisina como agente bactericida em bactérias Gram-negativas, como *S. liquefaciens*, tem sido objeto de diversos estudos. No entanto, a membrana externa presente nessas bactérias atua como uma barreira física, o que dificulta o acesso da nisina à parede celular e impede sua ação sobre o lipídeo II, um precursor do peptidoglicano e sítio ativo da bacteriocina (BREUKINK; DE KRUIJFF, 2006; HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000; VUKOMANOVIĆ et al., 2017). Por esta razão, nisina não inibiu o crescimento de *S. liquefaciens* L211. Resultados similares foram relatados por outros pesquisadores ao verificarem o efeito de nisina sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas. Prudêncio et al. (2015) demonstrou que a adição de 200 UA/mL de nisina em caldo BHI não apresentou efeito sobre o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium a 37°C. Da mesma forma, Proulx et al. (2017) não observou efeito inibitório significativo de nisina sobre o crescimento de *Escherichia coli* e *P. fluorescens* na superfície de queijo cheddar e queijo processado. Ao avaliar a sinergia entre a aplicação do ultrassom e nisina no processo de inativação das bactérias *Listeria innocua* e *E. coli*, Costello et al. (2021) constataram que, isoladamente, a nisina não exibe eficácia para a inativação da bactéria Gram-negativa *E. coli*. A barreira da membrana externa representa um desafio a ser superado para que nisina possa ser utilizada de forma mais ampla como agente antimicrobiano.

Nisina é uma bacteriocina que tem sido amplamente estudada por suas propriedades antimicrobianas (KHAN; OH, 2016). Entretanto, este estudo revelou que nisina também apresenta efeito inibitório sobre a atividade enzimática de *S. liquefaciens* L211. A inibição da atividade proteolítica também foi observada em placas contendo ágar PCA suplementado com 1% de LDR adicionadas de 400 UA/mL. . No entanto, quando introduzimos nisina em concentração de 400 UA/mL em ágar tributirina, verificou-se inibição no crescimento de *S. liquefaciens* L211. Diante disso, investigou-se o impacto da presença de 200 UA/mL de nisina em ágar tributirina, revelando que, embora o crescimento de *S. liquefaciens* não tenha sido inibido, houve uma clara redução na atividade lipolítica. É descrito na literatura que nisina tem sua eficácia reduzida em produtos lácteos principalmente em produtos de pH neutro (GHARSALLAOUI et al., 2016; IBARRA-SÁNCHEZ et al., 2020). Isso se deve a vários fatores, como a falta de estabilidade da nisina em pH neutro, a interação com proteínas do leite e a presença de cátions divalentes (IBARRA-SÁNCHEZ et al., 2020). Além disso, a concentração de gordura na matriz alimentar afeta a atividade da nisina, uma vez que pode

ocorrer a bacteriocina pode se aderir aos glóbulos de gordura, reduzindo sua atividade (SOBRINO-LÓPEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2008). Portanto, a diferença de resposta da nisina em leite e meio de cultura pode ser atribuída a esses fatores que afetam sua atividade.

Embora a indústria de laticínios utilize métodos como a refrigeração e a pasteurização para garantir a qualidade e segurança do leite, esses tratamentos não são eficazes na inativação de enzimas produzidas por microrganismos psicrotóxicos, como as proteases e lipases termorresistentes (MACHADO et al., 2017; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; YANG et al., 2020). Como resultado, a atividade enzimática pode continuar mesmo após a aplicação desses tratamentos (MACHADO et al., 2017; YANG et al., 2020). A inibição da atividade enzimática é uma estratégia promissora para melhorar a qualidade do leite e produtos lácteos. Ao contrário dos métodos tradicionais utilizados pela indústria, a inibição da atividade de enzimas termorresistentes impede a hidrólise dos componentes do leite, melhora sua qualidade e prolonga sua vida útil.

A inibição das atividades proteolíticas e lipolíticas observada em *S. liquefaciens* L211 devido à adição de nisina no leite pode estar relacionada a alterações na expressão dos genes. Vários autores relataram que nisina pode regular a expressão de genes envolvidos em diversos mecanismos bacterianos, como os genes associados a processos metabólicos (MIYAMOTO et al., 2015; PINILLA; STINCONE; BRANDELLI, 2021), formação de biofilme (PIMENTEL-FILHO et al., 2014; SHIVAEI et al., 2021), produção de toxinas (SHIVAEI et al., 2021) e de outros fatores de virulência (SILVA et al., 2021; STINCONE et al., 2020). Com base nessas constatações, foi conduzida uma investigação sobre a possibilidade de que a inibição da atividade enzimática ocorresse a nível transcricional. Os resultados indicaram que a expressão relativa dos genes *ser1*, *ser2* e *lipA*, que codificam as proteases e lipase de *S. liquefaciens* L211, foi inibida em um período de 24 horas. O mecanismo pelo qual nisina inibe a transcrição dos genes que codificam proteases e lipases de *S. liquefaciens* L211 ainda é desconhecido. É possível que nisina se ligue a algum receptor presente na membrana ou que, de alguma forma, entre na célula para inibir a expressão dos genes. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer qual é o mecanismo exato.

A regulação da expressão gênica por nisina também foi observada por Pimentel-Filho et al. (2014) que demonstraram a expressão dos genes *icaD* e *fnbA*, relacionados com a formação de biofilme em *Staphylococcus aureus*, aumentou na presença dessa bacteriocina. Stincone et al. (2020) mostraram que nisina interfere na expressão de diversos genes em *Listeria monocytogenes*, incluindo os genes relacionados à formação de biofilme, proteínas de superfície bacteriana e proteínas associadas à virulência. Além de aumentar a expressão dos

genes relacionados à formação de biofilme, nisina também diminui a expressão de *hla*, SEA, SEB e SED, genes codificadores das toxinas estafilocócicas, como apresentado no estudo de Shivaee et al. (2021). Também em bactérias Gram-negativas, a expressão gênica foi afetada pela presença de nisina. Resultados obtidos por Silva et al. (2021) mostraram que nisina aumenta os níveis de expressão dos genes relacionados à virulência de *Salmonella enterica*.

Nisina é um peptídeo antimicrobiano catiônico. Sabe-se que muitos peptídeos antimicrobianos catiônicos possuem modo de ação duplo (VASILCHENKO; ROGOZHIN, 2019). Em altas concentrações, esses peptídeos causam danos às membranas celulares, eventualmente promovendo quebras na estrutura, mas em concentrações mais baixas, se translocam no citoplasma e interagem eletrostaticamente com o DNA ou ribossomo (GOTTSCHALK et al., 2015; POLIKANOV et al., 2018). A ação de peptídeos catiônicos sobre a expressão gênica tem sido constatada há algum tempo. A exposição de *Salmonella Typhimurium* a concentrações subletais do peptídeo antimicrobiano polimixina estimulou a expressão dos genes dos regulons PhoP/PhoQ e RpoS, relacionados com a virulência bacteriana e inibiu a transcrição dos genes relacionados com a síntese de flagelos e com o sistema de secreção tipo III associado a capacidade da bactéria de invadir células hospedeiras (BADER et al., 2003). O peptídeo antimicrobiano LL-37 regulou negativamente a expressão dos genes de endotoxina A, elastase e piocianina em *Pseudomonas aeruginosa* tendo potencial terapêutico para ser futuramente utilizado contra este patógeno oportunista (XIAO et al., 2022). O estudo dos efeitos dos peptídeos antimicrobianos catiônicos na expressão gênica pode levar a novas estratégias terapêuticas para combater bactérias resistentes a antibióticos convencionais.

Estes estudos mostram o potencial dos peptídeos antimicrobianos catiônicos, como a nisina, em regular a expressão gênica bacteriana. A regulação da expressão de genes em bactérias pode ajudar a melhorar a qualidade dos alimentos impedindo a produção de enzimas responsáveis pela deterioração dos produtos alimentícios.

## 5. Conclusão

Nisina não apresenta atividade bactericida nem bacteriostática sobre *S. liquefaciens*, uma vez que o crescimento bacteriano não foi afetado. Contudo, as atividades proteolítica e lipolítica foram fortemente inibidas por essa bacteriocina. Não há na literatura, nenhum relato sobre este efeito inibitório nisina sobre as atividades de enzimas hidrolíticas. A inibição das atividades de proteases e lipases foi em consequência da inibição da transcrição dos genes *ser1*, *ser 2* e *lipA* de *S. liquefaciens*. O mecanismo utilizado pela bactéria para regular a transcrição desses genes ainda é desconhecido e mais estudos são necessários para elucidar este fato. Conhecer este mecanismo pode ajudar a entender a interação de nisina com *S. liquefaciens* e até mesmo outras bactérias Gram-negativas, expandindo os conhecimentos sobre o modo de ação de nisina sobre os microrganismos.

Além disso, a utilização de nisina como conservante de alimentos pode ser ampliada visando, além da atividade bactericida, o controle da atividade enzimática dos microrganismos, aumentando assim a vida de prateleira dos produtos.

## 6. Referências bibliográficas

ABDOU, A. M. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 127–132, 2003.

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: Proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

BADER, M. W. et al. Regulation of *Salmonella* Typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 219–230, 2003.

BAGLINIÈRE, F. et al. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 38–45, 2017.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2004.

BERHANU, L. et al. Microbial quality of raw cow milk and its predictors along the dairy value chain in Southwest Ethiopia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 350, 2021.

BLACK, E. P.; KELLY, A. L.; FITZGERALD, G. F. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 3, p. 286–292, 2005.

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

BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 321–323, 2006.

CLETO, S. et al. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

COLANTUONO, A. et al. Milk substrates influence proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* strains. **Food Control**, v. 111, 2020.

COSTELLO, K. M. et al. The effect of ultrasound treatment in combination with nisin on the inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, 2021.

DECIMO, M. et al. Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, p. M2081–M2090, 2014.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130–138, 2003.

DUFOUR, D. et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 188–196, 2008.

FREITAS, L. L. DE et al. Modeling of *Shigella flexneri* inactivation by combination of ultrasound, pH and nisin. **LWT Food Science and Technology**, v. 109, p. 40–46, 2019.

GHARSALLAOUI, A. et al. Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262–1274, 2016.

GOTTSCHALK, S. et al. Amphibian antimicrobial peptide fallaxin analogue FL9 affects virulence gene expression and DNA replication in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 1504–1513, 2015.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162–7168, 2007.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2–3, p. 153–161, 2000.

HOOVER, D. G.; HARLANDER, S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. *In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Elsevier Inc., 1993. p. 23–39.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. A. et al. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2041–2052, 2020.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Food protection with chemicals, and by biocontrol. Em: **Modern Food Microbiology**. 7. ed. Boston: Springer US, 2005. v. 5p. 301–343.

JUVEN, B. J.; GORDIN, S.; LAUFER, A. Significance of psychrotrophic strains of *Serratia liquefaciens* in milk. **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 12, p. 938–941, 1979.

KAIBARA, F. et al. Construction of serralyisin-like metalloprotease-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* and their virulence in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 81, n. 1, p. 55–61, 2012.

KHAN, I.; OH, D.-H. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 376–384, 2016.

KRIVOROTOVA, T. et al. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 49–56, 2016.

LAFARGE, V. et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5644–5650, 2004.

MACHADO, S. G. et al. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842–M1849, 2015.

MACHADO, S. G. et al. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 65–71, 2016.

MACHADO, S. G. et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, 2017.

MARCHAND, S. et al. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 68–77, 2009.

MARTINS, M. L. et al. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 144–148, 2006.

MARTINS, M. L. et al. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 207–217, 2015.

MENDES, T. A. DE O. et al. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013.

MIYAMOTO, K. N. et al. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin. **Journal of Proteomics**, v. 119, p. 230–237, 2015.

OLIVEIRA, G. B. DE et al. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313–321, 2015.

ONER, M. E. The effect of high-pressure processing or thermosonication in combination with nisin on microbial inactivation and quality of green juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, 2020.

PIMENTEL-FILHO, N. DE J. et al. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 1–8, 2014.

PINILLA, C. M. B.; STINCONE, P.; BRANDELLI, A. Proteomic analysis reveals differential responses of *Listeria monocytogenes* to free and nanoencapsulated nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 346, 2021.

POLIKANOV, Y. S. et al. The mechanisms of action of ribosome-targeting peptide antibiotics. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, n. MAY, 2018.

PROULX, J. et al. Pulsed light and antimicrobial combination treatments for surface decontamination of cheese: Favorable and antagonistic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1664–1673, 2017.

PRUDÊNCIO, C. V. et al. Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to nisin combined with EDTA. **Food Control**, v. 61, p. 248–253, 2016.

PRUDÊNCIO, C. V.; VANETTI, M. C. D.; PRIETO, M. Tolerance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition. **Food Research International**, v. 69, p. 281–288, 2015.

SALGADO, C. A.; BAGLINIÈRE, F.; VANETTI, M. C. D. Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk. **LWT Food Science and Technology**, v. 126, 2020.

SHIVAE, A. et al. Effect of sub-lethal doses of nisin on *Staphylococcus aureus* toxin production and biofilm formation. **Toxicon**, v. 197, p. 1–5, 2021.

SILVA, F. P. DA et al. Effects of sub-lethal doses of nisin on the virulence of *Salmonella enterica* in *Galleria mellonella* larvae. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 4–5, 2021.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 329–343, 2008.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35–41, 1997.

STINCONE, P. et al. Nisin influence on the expression of *Listeria monocytogenes* surface proteins. **Journal of Proteomics**, v. 226, 2020.

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

TEH, K. H. et al. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 10, p. 742–747, 2011.

UKUKU, D. O.; FETT, W. F. Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate, and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2143–2150, out. 2004.

VASILCHENKO, A. S.; ROGOZHIN, E. A. Sub-inhibitory effects of antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, 2019.

VUKOMANOVIĆ, M. et al. Nano-engineering the antimicrobial spectrum of lantibiotics: Activity of nisin against Gram Negative bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

WU, M. et al. A review of potential antibacterial activities of nisin against *Listeria monocytogenes*: the combined use of nisin shows more advantages than single use. **Food Research International**, v. 164, p. 112363, 2023.

XIAO, Q. et al. The effects of LL-37 on virulence factors related to the quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Annals of Translational Medicine**, v. 10, n. 6, p. 284–284, 2022.

YANG, X. et al. The complex community structures and seasonal variations of psychrotrophic bacteria in raw milk in Heilongjiang Province, China. **LWT Food Science and Technology**, v. 134, 2020.

YUAN, L. et al. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. **LWT Food Science and Technology**, v. 84, p. 409–418, 2017.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

ZHOU, K. et al. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 12, 2011.