

ALEXANDRA MANOELA OLIVEIRA CRUZ

EFEITO DA NISINA SOBRE PATÓGENOS DA MASTITE BOVINA.

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

RESUMO

CRUZ, Alexandra Manoela Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Efeito da nisina sobre patógenos da mastite bovina.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-orientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Célia Alencar de Moraes.

A mastite é considerada a principal doença das vacas leiteiras, e é responsável pela maioria das perdas econômicas na pecuária de leite no mundo todo. Nesse trabalho foi determinado *in vitro* o perfil de sensibilidade à nisina para diferentes espécies de bactérias causadoras de mastite em bovinos. Além disso, foi analisada a ocorrência de resistência à nisina em isolados de *Staphylococcus aureus* e caracterizadas as alterações nas propriedades de superfície celular que contribuíram para o fenótipo de resistência à bacteriocina. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de nisina indicou que a maioria (87,6%) dos 250 isolados testados, originados de bovinos acometidos por mastite clínica e sub-clínica, foram sensíveis à bacteriocina dentro da faixa de concentração de 3,195 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Isolados selecionados de *S. aureus* que apresentavam CIM inicial de 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n=7) e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n=1), adquiriram resistência à nisina quando cultivados na presença de doses sub-letais da bacteriocina. Os isolados resistentes apresentaram CIM ≥ 100

$\mu\text{mol L}^{-1}$, e mantiveram o fenótipo de resistência mesmo quando transferidos por, aproximadamente, 120 gerações em meio de cultivo sem adição de nisina. Imagens de microscopia óptica indicaram que a nisina induziu a desagregação do arranjo típico de *S. aureus*. Imagens de *S. aureus* obtidas por microscopia de força atômica mostraram que a superfície das células sensíveis apresentou várias regiões irregulares, provavelmente decorrentes da extrusão de conteúdo citoplasmático. Na superfície das células resistentes não foram observadas deformações do envelope celular. Entretanto, observaram-se marcas semelhantes a cicatrizes que podem ter sido resultantes de alterações no envelope celular relacionadas à maior resistência à nisina. A análise do perfil de ácidos graxos de membrana de *S. aureus* não evidenciou diferenças significativas entre os isolados sensíveis e os resistentes à nisina. No entanto, as culturas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à nisina apresentaram diferenças ($P < 0,05$) de hidrofobicidade e carga líquida de membrana, indicando que o fenótipo de resistência é influenciado pelas propriedades do envelope celular.

ABSTRACT

CRUZ, Alexandra Manoela Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Effect of nisin against bovine mastitis pathogens.** Advisor: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisors: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Célia Alencar de Moraes.

Mastitis is considered the main disease of dairy cows and the major cause of economic losses in dairy farms around the world. In this study, the susceptibility to nisin of different bacterial isolates that cause mastitis in cattle was determined *in vitro*. Furthermore, the prevalence of nisin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates was analyzed and changes in the cell surface contributing to the bacteriocin resistance phenotype was characterized. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) to nisin indicated that most of the 250 isolates tested (87.6%), originated from cattle affected by clinic and subclinic mastitis, were susceptible to bacteriocin concentrations ranging from 3.195 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Selected isolates of *S. aureus* that showed initial MIC values of 12.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n=7) and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n=1), acquired resistance to nisin when grown in the presence of sublethal doses of the bacteriocin. Resistant isolates showed MIC \geq 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and maintained their

phenotype even after being cultivated for approximately 120 generations in culture media without nisin. Optical microscopy images indicated that nisin induced disaggregation of the typical arrangement of *S. aureus* cells. Atomic force microscopy images of *S. aureus* showed that the surface of sensitive cells had many irregular regions, probably caused by the extrusion of the cytoplasm. On the surface of resistant cells, no significant changes could be observed in the cell envelope. However, signs similar to scars were seen, which could have been the result of alterations in the cell envelope related to the nisin resistance phenotype. Analyses of the fatty acids profile in the cell membrane of *S. aureus* did not show significant differences between isolates that were nisin-sensitive and nisin-resistant. However, cultures of nisin-sensitive and nisin-resistant *S. aureus* showed differences ($P < 0.05$) in hydrophobicity and net charge of the cell membrane, indicating that the resistance phenotype is influenced by several cell wall properties.