

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MICOCINAS LIVRES E IMOBILIZADAS
OBTIDAS DE *Wickerhamomyces anomalus* FRENTE A COLIFORMES FECALIS**

CRISTIANE PERSEL

Cascavel
Fevereiro/2017

CRISTIANE PERSEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MICOCINAS LIVRES E IMOBILIZADAS
OBTIDAS DE *Wickerhamomyces anomalus* FRENTE A COLIFORMES FECAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra.

**Cascavel
Fevereiro/2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P548a Persel, Cristiane
Avaliação da atividade de micocinas livres e imobilizadas obtidas de *Wickerhamomyces anomalus* frente a coliformes fecais. / Cristiane Persel. — Cascavel, 2017.
53 p.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

1. *Wickerhamomyces anomalus*. 2. Micocinas. 3. Imobilização. 4. *Escherichia coli*. 5. Alginato de sódio. I. Gandra, Rinaldo Ferreira. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 615.1
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

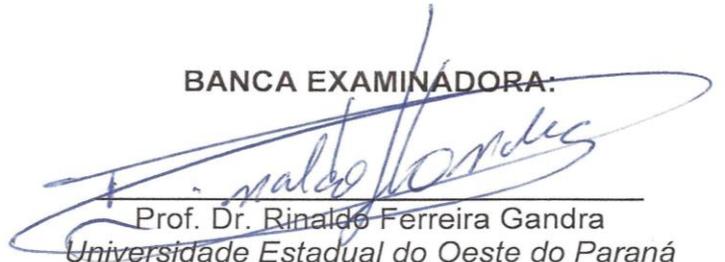
CRISTIANE PERSEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MICOCINAS LIVRES E IMOBILIZADAS
OBTIDAS DE *Wickerhamomyces anomalus* FRENTE A COLIFORMES FECALIS**

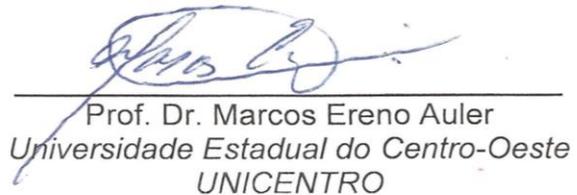
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

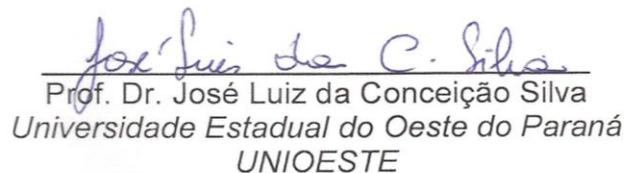
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof. Dr. Marcos Ereno Auler
Universidade Estadual do Centro-Oeste
UNICENTRO



Prof. Dr. José Luiz da Conceição Silva
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE

Cascavel - PR
Fevereiro/2017

BIOGRAFIA RESUMIDA

Nascida em Quedas do Iguaçu, PR, na data de 17 de Janeiro de 1989, filha de Paulo Vitorio Persel e Ilizabete Persel. Formada em 2011, em Ciências Biológicas (bacharelado e licenciatura), pela Faculdade Assis Gurgacz de Cascavel, PR. Pós-graduada, *Lato Sensu*, em Engenharia de Produção, em 2014, pelo Centro Universitário Internacional (UNINTER) – Polo de Quedas do Iguaçu – PR. Atualmente, mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Cascavel, área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde. Atuou como estagiária remunerada nos laboratórios de microbiologia do Laboratório de análises clínicas, ensino, pesquisa e extensão (LACEPE) da Unioeste, Cascavel – PR. Experiência profissional em laboratório de manipulação de medicamentos, professora do ensino fundamental e médio nas disciplinas de Ciências, Biologia e Química. No setor industrial, em gestão da qualidade e na área de vendas de produtos e equipamentos para laboratório.

*“Nada pode parar alguém com a
atitude ideal a conquistar sua meta,
nada na Terra pode ajudar alguém
sem comprometimento”.*

Thomas Jefferson

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, a Deus, que ilumina e abençoa a minha vida.

Aos meus pais, Paulo e Ilizabete, ao meu “namorado”, Cássio, pelo amor dedicado, pelo apoio dado e por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar mais esta etapa na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre me iluminou, guiou, protegeu e me deu sabedoria para enfrentar momentos difíceis na vida.

Ao meu orientador Rinaldo F. Gandra, o qual sempre me apoiou, desde o TCC, pela oportunidade de me orientar no mestrado e principalmente pela paciência e suporte para que conseguíssemos realizar a pesquisa.

Ao meu “namorado”, Cássio Henrique Geraldo, o qual sempre me apoiou, ajudou, deu forças quando precisei, foi paciente nos momentos difíceis e sempre esteve ao meu lado.

A todos os meus amigos e familiares, pelo amor e incentivo.

Aos meus colegas do laboratório de micologia e pesquisa, Ana Paula Paris, Caroline Simon, Daniele Schaab Boff e Mateus Foltz Delabeneta, por toda ajuda e sabedoria compartilhada em todos os momentos. Guardo vocês em meu coração pelo resto da minha vida.

Às estagiárias do LACEPE, Carol, Marcela, Juliane e Lana Rubia, por todo auxílio, conversas e risadas, convivência e paciência durante período da realização dos experimentos. Lembrarei com carinho de cada uma de vocês.

À Fundação Araucária e à Capes pelo apoio financeiro.

À minha amiga Talita M. Suguihiro, pelo incentivo e persistência, sendo que foi a primeira pessoa que apoiou minha ideia de fazer o mestrado. Também às minhas amigas, Gleícia e Kely, pela paciência, carinho, incentivo e tempo de convivência no apartamento 41 e na vida.

A todas as colegas das turmas de mestrado 2015 e 2016.

Aos meus pais, que acreditaram em mim e que fizeram de tudo para que eu pudesse realizar mais esta etapa em minha vida, sempre preocupados para que tudo ocorresse da melhor forma possível.

SUMÁRIO

BIOGRAFIA RESUMIDA	v
DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	5
Objetivo geral.....	5
Objetivos específicos	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
Micocinas	6
Aplicações de micocinas na indústria alimentícia	8
Micocinas com aplicação no biocontrole agrícola	10
Aplicação de micocinas sobre agentes patogênicos.....	11
Coliformes Fecais	12
Imobilização	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1: Imobilização e atividade antimicrobiana de micocinas obtidas de <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	23
CONCLUSÕES GERAIS	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
ANEXO 1	44

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

pH	Potencial hidrogeniônico
kDa	Kilodalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
WHO	World Health Organization
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
HUOP	Hospital Universitário do Oeste do Paraná
ASM	Ágar Sabouraud modificado
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFC	Unidades formadoras de colônias
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
rpm	Rotação por minuto
p/v	Peso por volume
Mol/L	Mol por litro
g	Grama
mm	Milímetro
h	Hora

AValiação DA ATIVIDADE DE MICOCINAS LIVRES E IMOBILIZADAS OBTIDAS DE *Wickerhamomyces anomalus* FRENTE A COLIFORMES FECAIS

RESUMO

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura produtora de micocinas, estas substâncias são glicoproteínas secretadas por algumas leveduras e possuem ação antimicrobiana com amplo espectro de atividade. *Escherichia coli* é a bactéria predominante do grupo de coliformes, sua presença na água indica contaminação fecal, sendo utilizada como indicador em análises microbiológicas de água. Apesar de pertencer à microbiota humana e animal pode ser patogênica, causando diversos tipos de infecções. A imobilização de células e substâncias demonstra grande potencial de aplicação biotecnológica em diversas áreas. Desta maneira, este trabalho objetivou avaliar a atividade de micocinas livres e imobilizadas, obtidas de *W. anomalus*, frente às cepas de *E. coli* e coliformes fecais. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo para avaliar a ação das micocinas livres, em diferentes diluições, frente a 45 cepas multirresistentes de *E. coli* isoladas de amostras clínicas. As micocinas foram imobilizadas em diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio, e testadas para verificar a atividade antimicrobiana frente à cepa de *E. coli* ATCC25922 e coliformes fecais presentes em amostras de água contaminadas com fezes. As micocinas foram capazes de inibir todas as cepas utilizadas na microdiluição em caldo, sendo que 100% das cepas foram inibidas pelas micocinas utilizadas puras e, mesmo diluídas, as micocinas apresentaram ação inibitória, a diluição de 1:2 inibiu 78,2% das cepas de *E. coli* multirresistentes. A concentração de alginato de sódio influenciou no formato dos grânulos obtidos na imobilização, resultado não observado ao variar a concentração de cloreto de cálcio. As micocinas imobilizadas com alginato de sódio a 2% e CaCl_2 0,2 mol/L apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente à cepa de *E. coli* ATCC25922. Os coliformes fecais foram inibidos pelas micocinas imobilizadas após 48h de incubação. Em síntese, neste estudo, as micocinas foram hábeis em inibir *E. coli* e coliformes presentes em amostras de água contaminada com fezes. Considerando a problemática de cepas multirresistentes a antibióticos e a necessidade de novas alternativas para melhorar a qualidade da água e efluentes de esgoto, tais resultados demonstram uma possível aplicação como alternativa para agente antimicrobiano.

PALAVRAS-CHAVE: *W. anomalus*, micocinas, imobilização, *E. coli*, alginato de sódio.

EVALUATION OF THE ACTIVITY FREE AND IMMOBILIZED MYCOCINS OBTAINED FROM *Wickerhamomyces anomalus* AGAINST FECAL COLIFORMS

ABSTRACT

Wickerhamomyces anomalus is mycocin-producing yeast, these substances are glycoproteins secreted by some yeasts and have antimicrobial action with broad spectrum of activity. *Escherichia coli* is the predominant bacterium of the coliform group, its presence in the water indicates fecal contamination, being used as indicator in microbiological analyzes of water. Although belonging to the human and animal microbiota can be pathogenic, causing various types of infections. The immobilization of cells and substances shows great potential of biotechnological application in several areas. In this way, this work aimed to evaluate the activity of free and immobilized mycocins, obtained from *W. anomalus*, against strains of *E. coli* and fecal coliforms. The broth microdilution method was used to evaluate the action of the free mycocins, in different dilutions, against 45 multiresistant strains of *E. coli* isolated from clinical samples. Mycocins were immobilized at different concentrations of sodium alginate and calcium chloride and tested for antimicrobial activity against *E. coli* strain ATCC25922 and fecal coliforms present in fecal contaminated water samples. The free mycocins were able to inhibit all the strains used in the broth microdilution, with 100% of the strains being inhibited by the pure used mycocins and, even when diluted, the mycocins showed an inhibitory action, the dilution of 1:2 inhibited 78.2% of the multiresistant strains of *E. coli*. The concentration of sodium alginate influenced the shape of the granules obtained in immobilization, a result not observed when the calcium chloride concentration varied. The mycocins immobilized with 2% sodium alginate and 0.2 mol/L CaCl₂ showed better antimicrobial activity against *E. coli* strain ATCC25922. Fecal coliforms were inhibited by immobilized mycocins after 48h of incubation. In summary, in this study, mycocins were able to inhibit *E. coli* and coliforms present in samples of water contaminated with feces. Considering the problem of multiresistant strains of antibiotics and the need for new alternatives to improve water quality and sewage effluents, these results demonstrate a possible application as an alternative to antimicrobial agents.

Key words: *W. anomalus*, mycocin, immobilization, *E. coli*, sodium alginate.

INTRODUÇÃO

Micocinas são glicoproteínas secretadas por algumas leveduras, as quais são denominadas leveduras killer ou micocinogênicas. Esta característica é considerada como um mecanismo de competição na natureza, utilizado como estratégia de sobrevivência das leveduras produtoras de micocinas, visto que, as micocinas são capazes de inibir o desenvolvimento de outros microrganismos competidores presentes no meio ambiente.

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura produtora de micocinas, sendo isolada de humanos, insetos, plantas, animais, alimentos, solos e ambientes aquáticos. A ação das micocinas, produzidas por esta levedura, possuem amplo espectro, inibindo o desenvolvimento de outras leveduras, fungos, bactérias e parasitas. Devido às suas características de desenvolvimento e à produção de micocinas, *W. anomalus* se destaca, podendo ser utilizada em diversos processos ligados a biotecnologia, biocontrole e clínico.

Para avaliar a qualidade microbiológica da água e de alimentos, verifica-se a presença de microrganismos indicadores de contaminação, *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à flora microbiana de humanos e animais, sua presença na água é um indicativo de poluição fecal, sendo utilizada como indicador em testes de controle de qualidade microbiológica da água e alimentos. Apesar de pertencer a microbiota, pode se tornar patogênica, causando diversas infecções, sendo que os efeitos que pode causar à população são considerados de grande importância, levando em conta, principalmente, a veiculação de doenças através da água, afetando diretamente a saúde pública.

O processo de imobilização é um método de aprisionamento, o qual possui vantagens, tais como: proteção e estabilidade das células, enzimas e compostos imobilizados. Várias substâncias podem ser utilizadas, dentre elas, o alginato de sódio, um polímero muito utilizado para esta técnica. A imobilização de células, enzimas e compostos bioativos possui grande potencial de aplicação biotecnológica, sendo empregados em processos industriais, clínicos e de biocontrole.

Considerando o efeito danoso causado pelas micocinas a outros microrganismos, e a necessidade de novos agentes antimicrobianos em diversas áreas de aplicação, a avaliação da atividade antimicrobiana de micocinas livres e imobilizadas se torna uma alternativa de grande interesse a respeito desta problemática.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a atividade de micocinas livres e imobilizadas obtidas de *Wickerhamomyces anomalus*.

Objetivos específicos

- Obtenção de micocinas a partir de sobrenadante da cultura da cepa *W. anomalus* WA40;
- Avaliação da atividade antimicrobiana das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *W. anomalus* frente às cepas de *Escherichia coli*;
- Imobilização das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *W. anomalus* utilizando alginato de sódio e cloreto de cálcio;
- Avaliação da atividade antimicrobiana das micocinas imobilizadas em alginato de cálcio frente a *E. coli*;
- Avaliação da atividade antimicrobiana das micocinas imobilizadas em alginato de cálcio frente aos coliformes fecais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Micocinas

As leveduras são seres unicelulares eucarióticos pertencentes ao Reino *Fungi*, encontradas em diferentes ambientes naturais, tanto aquáticos, terrestres, partículas no ar, animais e, inclusive, na microbiota humana, possuem capacidade de assimilação de vários compostos orgânicos, o que garante sua sobrevivência nestes ambientes. São consideradas de grande importância em muitos ecossistemas complexos, atuando como colonizadores iniciais de substratos, decompositores na natureza e possuem uma grande aplicabilidade em diversos processos biotecnológicos e de biocontrole (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Algumas leveduras possuem a capacidade de secretar substâncias de natureza proteica e com atividade antimicrobiana, as quais causam a morte de microrganismos do mesmo gênero, espécie ou de outras espécies. Este tipo de substância é denominada de micocina, toxina killer (BENDOVIÁ, 1986) ou ainda, zimocina (WEMHOFF; KLASSEN; MEINHARDT, 2014).

As leveduras capazes de produzir micocinas se distribuem em vários ambientes na natureza, podendo ser encontradas no solo, plantas, sedimentos, águas, animais, insetos, e também nos seres humanos (CABRAL et al., 2009; BUZDAR et al., 2011; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; VALZANO et al., 2016). As micocinas possuem efeito deletério a outros microrganismos sem a necessidade de contato direto de célula a célula (GOLUBEV, 1998), porém, as condições para que ocorra a produção e ação das micocinas é dependente de alguns fatores, tais como valores de pH e temperatura, sendo observado ser mais ativa em meios ácidos e inativadas em altas temperaturas (MAGLIANI et al., 1997; SANTOS; MARQUINA, 2004; GOLUBEV, 2006; LIMA et al., 2007).

Micocinas são glicoproteínas com peso molecular que varia de 18 a 300 kDa, dependendo da espécie produtora (SOARES; SATO, 2000), seu poder de ação é principalmente relacionado contra outras leveduras, que possuem receptores para esta toxina (MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015) porém, possuem efeito contra outros microrganismos, tais como, as bactérias (COMITINI et al., 2005).

O reconhecimento e ação das micocinas causam a morte de outras células microbianas que são sensíveis, estes mecanismos se diferem entre as micocinas produzidas (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002). De acordo com Starmer e Lachance (2011), o modo de ação das micocinas é ocasionado pela alteração do

gradiente iônico, afetando a célula do microrganismo sensível, o qual pode ocorrer por 4 diferentes mecanismos: (1) ruptura da membrana plasmática, causando a formação de canais, aumentando a permeabilidade e saída de íons; (2) inibição da síntese de DNA; (3) inibição da síntese de β -1,3-glucano e (4) impedimento do ciclo celular na fase G1.

A relação com a célula sensível, absorção e subsequente efeito danoso difere entre as micocinas produzidas, dependendo das condições específicas de cada levedura, variando conforme o gênero, espécie e ou linhagem do microrganismo produtor (MAGLIANI et al., 1997; BUZZINI; TURCHETTI; VAUGHAN-MARTINI, 2007).

Após a descoberta da produção de micocinas em *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower (1963), estudos em leveduras que secretam estas substâncias no ambiente indicaram que esta característica é um modelo de competição biológica e a ação pode afetar outros fungos, leveduras e bactérias (GOLUBEV, 2006; CAPPELLI et al., 2014).

Leveduras que secretam micocinas são denominadas leveduras killer ou micocinogênicas, e são caracterizadas conforme seu espectro de morte sobre outras cepas, levando em conta a sensibilidade e resistência destes microrganismos para as micocinas secretadas (GOLUBEV, 1998; SCHMITT; BREINIG, 2002; CHEN et al., 2000). Os microrganismos sensíveis possuem receptores específicos na parede celular, mediando à atividade killer, a qual os danifica, sejam estes da mesma espécie ou de outra, porém cepas produtoras de micocinas são imunes ao seu efeito, mas podem ser sensíveis às toxinas de outros microrganismos (BEVAN; MAKOWER, 1963; SCHMITT; BREINIG, 2002). Leveduras neutras se caracterizam por não produzirem micocinas e não serem susceptíveis a elas. Outro fato interessante a respeito deste fenômeno é de que cepas que produziam micocinas e perderam esta característica continuaram imunes a elas (SCHMITT; BREINIG, 2002).

A produção de micocinas já tem sido relatada em várias outras espécies dos demais gêneros de leveduras dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, além da espécie *S. cerevisiae*, a primeira a ser estudada. Estes microrganismos produtores de micocinas podem ser isolados de diferentes habitats em várias regiões do mundo, sendo os mais destacados dos gêneros: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Rhodothorula*,

Schwanniomyces, *Torulopsis*, *Ustilago* e *Zigowilliopsis* (CHEN et al., 2000; SCHMITT; BREINIG, 2002). A produção de micocinas pode ser considerada como estratégia de sobrevivência no ambiente, a qual representa vantagem para a espécie entre espécies competidoras no mesmo hábitat (CAPELLI et al., 2014), habilitando as leveduras produtoras a serem grandes competidores e impedindo o desenvolvimento de outros microrganismos pela liberação de micocinas no meio (STOLL et al., 2005).

Wickerhamomyces anomalus, denominada antigamente por *Pichia anomala* e *Hansenula anomala*, é uma levedura considerada não patogênica, pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae*, desenvolve-se facilmente em diferentes condições de temperatura, osmolaridade e pH, sendo isolada de insetos, plantas, animais, humanos, alimentos, solo e ambientes aquáticos. Algumas cepas desta levedura possuem atividade antimicrobiana, pois são capazes de produzir micocinas que inibem o crescimento de vários microrganismos patogênicos, tais como: leveduras, fungos filamentosos, bactérias e parasitas (WALKER; MCLEOD; HODGSON, 1995; FREDLUND et al., 2002; KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008; STARMER; LACHANCE, 2011; WALKER, 2011; CAPELLI et al., 2014; VALZANO et al., 2016). Devido ao amplo espectro de atividade antimicrobiana e grande estabilidade, as micocinas de *W. anomalus* possuem aplicabilidade em processos da indústria alimentícia, biocontrole agrícola e na área clínica (MAGLIANI et al., 1997; PASSOTH et al., 2006; WALKER, 2011).

As leveduras produtoras de micocinas possuem características que possibilitam a aplicação em vários processos biotecnológicos ligados a alimentos, rações, biopreservação e fermentação (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002; STARMER; LACHANCE, 2011; SCHNEIDER et al., 2012).

Aplicações de micocinas na indústria alimentícia

Leveduras que apresentam a produção de micocinas têm sido utilizadas na indústria alimentar para diferentes fins, a maioria das aplicações é destinada para controlar a fermentação, conferindo uma melhoria na qualidade do produto final (LLORENTE et al., 1997; COMITINI et al., 2005; MAQUEDA et al., 2012; ORO et al., 2013; MEHLOMAKULU; SETATI; DIVOL, 2014). Ullivarri, Mendoza e Raya (2014) verificaram que uma cultura mista composta de *S. cerevisiae* CF8 e

Wickerhamomyces anomalus CF20 foi utilizada como agente de biocontrole no processo de vinificação, tendo como resultado uma inibição do crescimento de microrganismos alteradores de propriedades aromáticas e químicas do vinho, conferindo ao produto melhores características organolépticas.

Colaborando com esta visão, as micocinas podem ocasionar uma prevenção de efeitos indesejáveis em produtos, tais efeitos causados por outras leveduras durante o processo de fermentação. O bom rendimento da ação de micocinas nestes processos é observado, uma vez que possuem vantagem competitiva sobre as leveduras que atuam no processo de fermentação alcoólica (CECCATO-ANTONINI; TOSTA; SILVA, 2004).

Considerando ainda a aplicação de micocinas em processos fermentativos, na produção de vinhos, as mesmas podem proporcionar um método alternativo para a prevenção do crescimento indesejado de outras leveduras, sendo uma alternativa a adição de dióxido de enxofre no processo de vinificação (YAP et al., 2000; CIANI; FATICHENTI, 2001). Santos et al. (2009) verificaram que a micocina PMKT2 produzida pela levedura *Pichia membranifaciens* CYC 1086 foi capaz de inibir *Brettanomyces bruxellensis* num processo fermentativo, não causando danos à levedura *Saccharomyces cerevisiae* (responsável pela fermentação), a qual foi resistente à micocina, indicando que PMKT2 é uma forte candidata como agente antimicrobiano em fermentações, para evitar o desenvolvimento de levedura não desejada, sem danificar a espécie fermentadora. O mesmo efeito sobre as leveduras testadas foi verificado pelas micocinas produzidas por *Ustilago maydis*, tal que, a sua atividade de controle biológico foi comprovada na produção e condições de envelhecimento de vinhos, já que pequenas concentrações de micocinas diminuíram a síntese de fenóis voláteis, produzidos por *B. bruxellensis*, tais compostos são responsáveis por mudanças no aroma do produto (SANTOS et al., 2011).

Lowes et al. (2000) relatam que a micocina denominada HMK, produzida pela levedura *Williopsis mrakii* atuou como agente de biocontrole durante o processo de fabricação de iogurtes, esta micocina demonstrou atividade inibitória sobre várias espécies de leveduras deteriorantes, conferindo uma ação de maior eficácia do que os conservantes utilizados na indústria.

Micocinas com aplicação no biocontrole agrícola

O papel de leveduras produtoras de micocinas na agricultura como agentes de biocontrole é ainda recente e necessita ser explorada. Vários estudos vêm sendo realizados para conhecer e descobrir o efeito de micocinas sobre microrganismos causadores de várias doenças em plantas de importância agrícola. Devido à necessidade de novos agentes biológicos e procura por produtos saudáveis e naturais, é dada uma atenção maior sobre a segurança e qualidade destes produtos. Cabral et al. (2009) relataram a atividade inibitória da levedura killer *Dipodascus capitatus* frente ao fungo causador da doença vassoura-de-bruxa, *Moniliophthora perniciosa*, que acomete plantações de cacau na região amazônica. Em outro trabalho, utilizaram-se as micocinas produzidas por *Pichia membranifaciens* CYC 1106 sobre *Botrytis cinerea*, agente causador do mofo cinzento em plantas, o sobrenadante contendo micocinas exerceu um efeito fungicida sobre *B. cinerea*, sendo que as vinhas tratadas não apresentaram os sintomas da doença (SANTOS; MARQUINA, 2004).

A utilização de micocinas como agentes de biocontrole é possível devido a sua ação antimicrobiana, podendo ser citado o *Cryptococcus albidus*, como uma alternativa aos fungicidas químicos contra fungos pós-colheita de frutas armazenadas (FREDLUND et al., 2002).

Rosa-Magri, Tauk-Tornisielo e Ceccato-Antonini (2011) relataram que, além da competição por nutrientes, a levedura *Torulaspota globosa* produz micocinas, estes mecanismos controlaram o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos causadores de antracnose em sorgo, e este tipo de ação capacita a utilização para controle biológico, porém os pesquisadores ressaltam a importância de mais análises sobre as micocinas produzidas para verificação de seus mecanismos de ação.

Walker, Mcleod e Hodgson (1995) relatam a ação *in vitro* de micocinas oriundas de *S. cerevisiae* sobre o crescimento de diversos fungos fitopatogênicos, responsáveis por doenças em plantas e deterioração de madeira, e explicam que a ação das micocinas ocorre devido a lise celular ocasionada nas células dos microrganismos sensíveis.

Aplicação de micocinas sobre agentes patogênicos

Magliani et al. (2004), relatam a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos devido ao aumento de microrganismos patogênicos resistentes às drogas antimicrobianas. As micocinas apresentam um grande potencial e são consideradas fontes naturais de propriedades antimicrobianas contra agentes patogênicos, devido a sua ampla ação inibitória contra fungos e bactérias, os quais são causadores de infecções em animais e humanos (MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015). Paris et al. (2016) verificaram que micocinas obtidas de *W. anomalus* apresentaram baixa atividade citotóxica quando analisaram os extratos em contato a eritrócitos obtidos de um indivíduo saudável, e também apresentaram ação inibitória frente a diversas cepas patogênicas de *C. albicans*. Desta maneira, as micocinas podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação em dermatofitoses crônicas e severas (CARNEIRO et al., 2009).

As micocinas obtidas de *Pichia anomala* ocasionaram efeito danoso sobre cepas do gênero *Candida spp.*, inibindo o desenvolvimento destas leveduras patogênicas, um resultado de grande importância, já que espécies deste gênero são os maiores causadores de doenças fúngicas (IZGÜ et al., 2007).

A ação de diferentes micocinas pode ser utilizada como marcador epidemiológico de leveduras, sendo utilizado para verificar a origem e disseminação em populações diversas, assegurando o conhecimento preciso das leveduras presentes nas infecções fúngicas. Polonelli et al. (1983) preconizaram o método conhecido como Sistema Killer, esta técnica de biotipagem baseia-se na sensibilidade de cepas de *Candida albicans* frente às micocinas produzidas por 9 espécies pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*. O emprego desse método auxilia na compreensão do fenótipo de leveduras quanto à diversidade dos microrganismos isolados estabelecidos em uma dada infecção fúngica ou envolvidos na colonização de um sítio anatômico (RIBEIRO et al., 2011). Também pode estabelecer a fonte de origem da infecção, bem como, controlar e acompanhar as infecções fúngicas nosocomiais (CÂNDIDO et al., 1995).

Ribeiro et al. (2011) conseguiram mapear o comportamento epidemiológico de amostras de *C. albicans* envolvidas no processo de colonização da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e também nos pais ou responsáveis pela cromossomopatia. Buzzini, Turchetti e Vaughan-Martini (2007) ressaltam ainda que

este método é uma ferramenta simples, barata, sensível e reprodutível para biotipagem de microrganismos de importância clínica.

Como relatado anteriormente, o espectro de ação de micocinas pode ocorrer sobre fungos e bactérias, a micocina RY55 produzida por *Pichia kudriavzevii* exerceu atividade inibitória sobre várias bactérias patogênicas de importância clínica e saúde humana, tais como: *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas alcaligenes* (BAJAJ; RAINA; SINGH, 2013).

Coliformes Fecais

A qualidade microbiológica da água e de alimentos pode ser mensurada através da presença de indicadores bacterianos, como os coliformes (NOBLE et al., 2003). Estes microrganismos são utilizados como parâmetro e são divididos em coliformes totais e fecais. Os coliformes fecais, também denominados como termotolerantes, podem apresentar espécies de bactérias de três gêneros: *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (KAGKLI et al., 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2011), a presença de coliformes, patógenos oriundos das fezes de humanos e animais, é o principal indicador para verificar a qualidade da água, sendo que estes microrganismos representam um perigo à população e indicam a possível presença de outros microrganismos causadores de problemas à saúde, quanto maior o número de coliformes em uma amostra, maior a chance da presença de microrganismos patogênicos.

Escherichia coli é a bactéria predominante do grupo de coliformes fecais, sua presença na água significa contaminação fecal, devido a isto, é considerada um indicativo determinante em testes de controle de qualidade microbiológica da água e efluentes (WEINTRAUB, 2007; WHO, 2011). Esta bactéria Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é encontrada na microbiota intestinal, sendo eliminada nas fezes de humanos e de animais. Mesmo sendo pertencente à flora microbiana, *E. coli* é responsável por várias infecções, tais como infecções do trato urinário, septicemia, gastroenterite, pneumonia e meningite. Desta maneira, pode ser categorizada como patogênica extraintestinal, enteropatogênica e comensal. É também responsável por diversos surtos de diarreia, principalmente em crianças (KAPER et al., 2004; LUES et al., 2007; FREITAS et al., 2013; ATIDÉGLA et al., 2016).

Outro ponto relacionado à patogenicidade de cepas de *E. coli* é a resistência a antibióticos, desta maneira, é de grande importância a descoberta de novas alternativas de agentes antimicrobianos para tratar e prevenir infecções por esta e outras bactérias (CHEN et al 2015).

Considerando que os estudos de compostos antimicrobianos secretados por leveduras estejam ainda numa fase de desenvolvimento, explorar e elucidar a atividade de tais compostos, que são produzidos por estes microrganismos, é de fato uma estratégia para encontrar novos candidatos a antibióticos (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012; SVAHN et al., 2012).

Imobilização

A imobilização de células e substâncias demonstra grande potencial de aplicação biotecnológica nas áreas industrial, de biocontrole, clínica e ambiental, sendo utilizada em várias pesquisas científicas (KHALIL; MANSOUR, 2006; KING et al., 2007; HOESLI et al, 2010; JAYAKUMAR et al., 2012; ALOUI et al., 2015).

O aprisionamento de um material no interior ou através de uma matriz é denominado de imobilização (MITROPOULOU et al., 2013). Uma molécula imobilizada é aquela em que o movimento no espaço é restrito e estável e ou limitado a certa região, ligado a uma estrutura sólida, de maneira definida (FERNANDEZ-LAFLUENTE et al., 1998; MATEO et al., 2007). A imobilização também pode ser definida como a retenção de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989). Técnicas de imobilização celular ajudam a segregação de uma célula em um ambiente adverso (WESTMAN; TAHERZADEH; FRANZÉN, 2012), garantindo melhor resistência ao estresse e conseqüentemente um melhor desempenho (NEDOVIĆ et al., 2014).

Covizzi et al. (2007) relatam que a imobilização microbiana oferece muitas vantagens, tais como: elevada concentração de imobilizados, uma melhor resistência à contaminação, a estimulação da produção e secreção de metabólitos secundários e a proteção física e química das células e compostos bioativos.

A imobilização celular utilizando alginato é a mais preconizada, devido ao seu fácil manuseio, propriedades atóxicas, biocompatibilidade, disponibilidade e baixo custo (KAWAGUTI; SATO, 2008; WESTMAN; TAHERZADEH; FRANZÉN, 2012; DUARTE et al., 2013). O alginato de sódio é um biopolímero de origem natural

extraído de algas marrons (GOMBOTZ; WEE, 1998; GOH; HENG; CHAN, 2012), é um polissacarídeo constituído por ácido manurônico e ácido gulurônico, (WESTMAN; TAHERZADEH; FRANZÉN, 2012). Blevé et al. (2011) relatam ainda algumas outras vantagens da utilização do alginato de sódio, tal como, ser capaz de fornecer uma matriz adequada para microrganismos e biomoléculas, como exemplo, citaram que em processos de fermentação, as vantagens vão desde prolongação da atividade, estabilidade do imobilizado, controle no crescimento das células não produtivas, uso contínuo e reutilização do imobilizado. A imobilização de células microbianas em alginato de sódio é de fácil preparo, resultando na formação de esferas de alginato de cálcio formadas através da troca iônica entre o alginato de sódio e a solução de cloreto de cálcio (GOMBOTZ; WEE, 1998; ULUDAG et al., 2000).

Considerando a ação das micocinas e a busca por novas alternativas de controle microbiano, avaliar a atividade de micocinas livres e imobilizadas frente a coliformes fecais se torna de grande valia e contribui ao desenvolvimento e pesquisa de novos agentes com ação antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ALOU, H.; LICCIARDELLO, F.; KHAOULA, K.; HAMD, M.; RESTUCCIA, C.. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 200, p.22-30, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.015>.
- BAJAJ, B.K.; RAINA, S.; SINGH, S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. **Journal Of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 8, p.645-656, 7 set. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200187>.
- BENDOVIÁ, O. The killer phenomenon in yeasts. **Folia Microbiologica**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.422-433, out. 1986. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02936607>.
- BEVAN E.A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. In: **Proceeding of the 11th International Conference on Genetics**, Oxford Pergamon Press, Oxford; v. 1, 1963, p. 53–58.
- BLEVE, G.; LEZZI, C.; CHIRIATTI, M.A.; D'OSTONI, I.; TRISTEZZA, M.; DI VENERE, D.; SERGIO, L.; MITA, G.; GRIECO, F. Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.982-989, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.059>.
- BUZDAR, M.A.; CHI, Z.; WANG, Q.; HUA, M.; CHI, Z.. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 91, n. 6, p.1571-1579, 6 maio 2011. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3220-8>.
- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHAN-MARTINI, A.E. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. **Fems Yeast Research**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.749-760, set. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00238.x>.
- CABRAL, A.S.; CARVALHO, P.M.B.; PINOTTI, T.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; MACRAE, A. Killer yeasts inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.108-110, mar. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822009000100018>.
- CÂNDIDO, R.C.; FISCHMAN, O.; ZAROR, L.; ITO, I.Y. Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema killer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.321-324, dez. 1995. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86821995000400003>.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**. [s.l.], v.3, p. 3-20, 1989.

CAPPELLI, A.; ULISSI, U.; VALZANO, M.; DAMIANI, C.; EPIS, S.; GABRIELLI, M.G.; CONTI, S.; POLONELLI, L.; BANDI, C.; FAVIA, G.; RICCI, I. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.1-9, 1 maio 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095988>. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095988>>. em: 10 jul. 2016.

CARNEIRO, I.D.D.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, B.M.; OLIVEIRA, R.Q.; UETANABARO, A.P.T. Atividade "killer" de microrganismos leveduriformes contra leveduras patogênicas ao homem. *In*: 61ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 61., 2009, Feira de Santana. **Reunião Anual da SBPC**. Feira de Santana: Spbc, 2009. v. 1, p. 1 - 2. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/6875.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; TOSTA, C.D.; SILVA, A.C. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.13-23, mar. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132004000100003>.

CHEN, W.B.; HAN, Y.F.; JONG, S.C.; CHANG, S.C. Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. **Applied and environmental Microbiology**, [s.l.], v. 66, n. 12, p.5348-5352, Dez. 2000. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/66/12/5348.long>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

CHEN, Y.; AORIGELE, C.; WANG, C.; SIMUJIDE, H.; YANG, S. Screening and Extracting Mycocin Secreted by Yeast Isolated from Koumiss and Their Antibacterial Effect. **Journal Of Food And Nutrition Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.52-56, 23 jan. 2015. Science and Education Publishing Co., Ltd.. <http://dx.doi.org/10.12691/jfnr-3-1-9>.

CIANI, M.; FATICHENTI, F.. Killer Toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a Biopreservative Agent to Control Apiculate Wine Yeasts. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 7, p.3058-3063, 1 jul. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.7.3058-3063.2001>.

COMITINI F.; FERRETTI R.; CLEMENTI F.; MANNAZZU I.; CIANI M. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.105-111, jul. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02579.x>.

COVIZZI, L.G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; DA SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciência Exatas e Tecnológicas*, 28, (2), 143-160, 2007. D.O.I.: 10.7198/S2237-0722201500030007

DUARTE, J.C., RODRIGUES, J.A.R., MORAN, P.J.S., VALENÇA, G.P., NUNHEZ, J.R. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. **AMB Express**, [s.l.], v.3, n.31, p.1-30, 2013. <http://doi.org/10.1186/2191-0855-3-31>. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3695878/?report=reader>> Acesso em 10 jul. 2016.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E.; LINGSTEN, K.J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast J121. **Fems Yeast Research**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.395-402, ago. 2002. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s1567-1356\(02\)00098-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1567-1356(02)00098-3).

FREITAS, E., AIRES, A., ROSA, E. A. D. S. AND SAAVEDRA, M. J. Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of Escherichia coli from clinical and animal source. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], p.266-273, jun. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12105>.

GOH, C.H.; HENG, P.W.S.; CHAN, L.W.. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. [s.l.] v. 88, n. 17, p 1-12, 2012. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711010046>> Acesso em 05 Julho 2016.

GOLUBEV, W.I. Micocins (killer toxins). In, “**The Yeast. A taxonomy Study**”, Kurtzman C.P. & Fell J.W. Londres, Academic Press 1998, p.55-65.

GOLUBEV, W.I. Antagonistic interactions among yeast. In: **The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Rosa, C.A. & Peter, G., Berlin, Springer, c. 10, 2006, p.197-219.

GOMBOTZ, W.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.267-285, 4 maio 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(97\)00124-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(97)00124-5).

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 3, p.1-12, 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>.

HOESLI, C.A.; RAGHURAM, K.; KIANG, R.L.J.; MOCINECOVÁ, D.; HU, X.; JOHNSON, J.D.; LACÍK, I.; KIEFFER, T.J.; PIRET, J.M. Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation. **Biotechnol. Bioeng.**, [s.l.], v. 108, n. 2, p.424-434, 17 nov. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22959>.

İZGÜ, F.; ALTĐNBAY, D.; TÜRELI, A.E. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycocin, a Novel Exo- β -1,3-Glucanase Isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. **Microbiology And Immunology**, [s.l.], v. 51, n. 9, p.797-803, set. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03975.x>.

JAYAKUMAR, R. AMRITA, N.; SANJOJ, R.N.; MAYA, S.; NAIR, S.V.I. Doxorubicin-loaded pH-responsive chitin nanogels for drug delivery to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.2352-2356, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.040>.

KAGKLI, D.M.; VANCANNEYT, P.; HILL, C.; COGAN, T.M.. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 103, n. 5, p.1393-1405, 17 abr. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03338.x>.

World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 2011, 564p. Disponível em: <http://apps.who.int/EDBB31E0-6F2D-48F6-BF39-002A07422B5D/FinalDownload/DownloadId-FFE8B85D8ED04AB0CBF81924CE97764B/EDBB31E0-6F2D-48F6-BF39-002A07422B5D/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em: 10 julho 2016.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T.. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.123-140, fev. 2004. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H.. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. *Química Nova*, 31 (1), 134-143, 2008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100025>

KHALIL, A.H.; MANSOUR, E.H.. Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 63, n. 4, p.702-705, 20 jul. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15817.x>.

KING, V.A.; HUANG, H. TSEN, J. Fermentation of tomato juice by cell immobilized *Lactobacillus acidophilus*. **Mid-Taiwan Journal of Medicine**. s.l.], v. 12, N. 1, p.22-30, 2007.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E.. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. **Fems Yeast Research**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.939-954, set. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x>.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.E.; BOEKHOUT, T. Definition, classification and Nomenclature of the Yeasts, *In* "**The Yeasts**" **A Taxonomic Study**, 5. Ed. Londres, Elsevier Science, 2011, p. 03-05.

LIMA, J.R.; BRUNO, L.M.; SILVA, J.L.A.; CASIMIRO, A.R.S. Potencial de utilização de leveduras "killer" para produção de cachaça. **Rev. Ciên. Agron.** Fortaleza, v. 38, n. 4, p.366-371, Out-Dez 2007. ISSN 1806-6690 (online). Disponível em: <<http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/95/321>> Acesso em 10 Jul. 2016.

LLORENTE, P.; MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M.; SPENCER-MARTINS, I. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.3, p. 1165–1167, Mar. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168407/>>. Acesso em: 09 julho 2016.

LOWES, K.F.; SHEARMAN, C.A.; PAYNE, J.; MACKENZIE, D.; ARCHER, D. B.; MERRY, R. J.; GASSON, M. J. Prevention of Yeast Spoilage in Feed and Food by the Yeast Mycocin HMK. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v.66, n.3, p. 1066–1076, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91944/>>. Acesso em: 09 julho 2016.

LUES, J. F. R.; THERON, M.M.; VENTER, P. RASEPHEI, M.H.R.. Microbial Composition in Bioaerosols of a High-Throughput Chicken-Slaughtering Facility. **Poultry Science**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.142-149, 1 jan. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ps/86.1.142>.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; & POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 369–400, Jul. 1997.

MAQUEDA, M.; ZAMORA, E.; ÁLVAREZ, M. L.; RAMÍREZ, M. Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto* Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 78, n. 3, p.735-743, 18 nov. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.06518-11>.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J.. Biology of killer yeasts. **Int Microbiol**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.65-71, 29 maio 2002. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, Madrid, v. 6, n. 40, p.1451-1463, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907000506>>. Acesso em: 10 julho 2016.

MEHLOMAKULU, N.N.; SETATI, M.E.; DIVOL, B.. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 188, p.83-91, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>.

MENEGHIN, M.C; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 53, n. 5, p.1043-1050, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132010000500006>.

MITROPOULOU, G.; NEDOVIC, V.; GOYAL, A.; KOURKOUTAS, Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. **Journal of Nutrition and**

Metabolism, [s.l.], v. 2013, p.1-15, 2013. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/716861>.

MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.588-611, 10 out. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms3040588>.

NEDOVIĆ, V.; GIBSON B.; MANTZOURIDOU, T.F.; BUGARSKI, B.; DJORDJEVIĆ, V.; KALUŠEVIĆ, A.; PARASKEVOPOULOU, A.; SANDELL, M.; ŠMOGROVIČOVÁ, D.; YILMAZTEKIN, M. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast*, 32 (1), 173-213, 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3042>.

NOBLE, R.T.; MOORE, D.F.; LEECASTER, M.K.; MCGEE, C.D.; WEISBERG, S.B. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. **Water Research**, [s.l.], v. 37, n. 7, p.1637-1643, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00496-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00496-7).

ORO, L.; ZARA,S.; FANCELLU, F.; MANNAZZU, I.; BUDRONI, M.; CIANI, M.; COMITINI, F. Tp BGL2 codes for a *Tetrapisipora phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts. **Fems Yeast Research**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.464-471, 20 dez. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12126>.

PARIS, A.P.; PERSEL,C.; SERAFIN, C.F.; SIMÃO, R.C.G; GANDRA,R.F. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 6, p.878-884, 16 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-016-1135-4>.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U. Ä.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 3–13 2006. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **J. Clin. Microbiol.** 24, 866–869,1986. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/24/5/866.long>> Acesso em 18 dezembro 2016.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G.. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v.17, n.5, p.774–780, 1983.

RIBEIRO, E.L.; CARDOSO, C.G.; CAMPOS, C.C.; CARVALHAES, M.S.; TOLEDO, O.A.; PIMENTA, F.C. Comportamento dos isolados bucais de *Candida albicans* de crianças com Síndrome de *Down* e pais e/ou responsáveis às toxinas *killer*. **ClipeOdonto**. [s.l.], v.3, n. 1, p. 28-31, 2011. Disponível em: <<http://periodicos.unitau.br/ojs-2.2/index.php/clipeodonto/article/viewFile/1211/895>> acesso em 10 julho 2016.

ROSA-MAGRI, M.M; TAUk-TORNISIELO, S.M.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic

molds. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.1-5, fev. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132011000100001>.

SANTOS, A.; MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, [s.l.], v. 150, n. 8, p.2527-2534, 1 ago. 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27071-0>. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27071-0#tab2>>. Acesso em: 10 julho 2016.

SANTOS, A.; SAN MAURO M.; BRAVO, E.; MARQUINA, D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Microbiology**, [s.l.], v. 155, n. 2, p.624-634, 1 fev. 2009. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.023663-0>.

SANTOS, A.; NAVASCUÉS, E.; BRAVO, E.; MARQUINA, D. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 145, n. 1, p.147-154, 31 jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.005>.

SCHNEIDER, J.; RUPP, O.; TROST, E.; JAENICKE, S.; PASSOTH, V.; GOESMANN, A.; TAUCH, A.; BRINKROLF, K. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **Fems Yeast Research**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.382-386, 23 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x>.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F.. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.257-276, ago. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.291-297, out. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822000000400010>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000400010>. Acesso em: 10 julho 2016.

STARMER, W.T.; LACHANCE, M.A.T. In “**The Yeasts**”: **A taxonomic study**”, Kurtzman, C.P.; Fell, J.W; Boekhout, 5ª ed., Londres, Elsevier Science, 2011. Cap. 6, Vol. 01, p. 65-83.

STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F.. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. **Mycological Research**, [s.l.], v. 109, n. 3, p.342-356, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s0953756204002229>.

SVAHN, K. S.; GÖRANSSON, U.; EL-SEEDI, H.; BOHLIN, L.; LARSSON, D. G. J.; OLSEN, B., CHRYSANTHOU, E. Antimicrobial activity of filamentous fungi isolated from highly antibiotic-contaminated river sediment. **Infection Ecology &**

Epidemiology, [s.l.], v. 2, p.1-6, 24 maio 2012. Co-Action Publishing. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v2i0.11591>

ULLIVARRI, M. F.; MENDOZA, L. M.; RAYA, R. R.. Killer yeasts as biocontrol agents of spoilage yeasts and bacteria isolated from wine. **Bio Web Of Conferences**, [s.l.], v. 3, p.1-4, 2014. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/bioconf/20140302001>

ULUDAG, H.; VOS, P.; TRESKO, P.A.. Technology of mammalian cell encapsulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 1-2, p.29-64, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00053-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00053-3).

WALKER, G.M.; McLEOD, A.H.; HODGSON, V.J.. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *Fems Microbiology Letters*, [s.l.], v. 127, n. 3, p.213-222, abril 1995.

WALKER, G.M.. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.25-34, 14 ago. 2011. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10482-010-9491-8>>. Acesso em: 09 julho 2016.

WEINTRAUB, A.. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.4-8, 1 jan. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46930-0>.

WEMHOFF, S.; KLASSEN, R.; MEINHARDT, F.. Site-Directed Mutagenesis of the Heterotrimeric Killer Toxin Zymocin Identifies Residues Required for Early Steps in Toxin Action. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 20, p.6549-6559, 15 ago. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02197-14>. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/80/20/6549.full>>. Acesso em: 10 julho 2016.

WESTMAN, J.O.; TAHERZADEH, M.J.; FRANZÉN, C.J. Proteomic Analysis of the Increased Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Encapsulated in Liquid Core Alginate-Chitosan Capsules. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.1-12, 9 nov. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049335>. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3494678/pdf/pone.0049335.pdf>>. Acesso em: 10 julho 2016.

VALZANO, M.; CECARINI, V.; CAPELLI, A.; CAPONE, A.; BOZIC, J.; CUCCIOLONI, M.; EPIS, S.; PETRELLI, D.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A.M.; FAVIA, G.; RICCI, I.. A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. **Malar J**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-9, 11 jan. 2016. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-1059-7>.

YAP, N.A.; LOPES, M.B; LANDRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A.The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 89, n. 3, p.381-389, set. 2000. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01124.x>.

CAPÍTULO 1

Imobilização e atividade antimicrobiana de micocinas obtidas de *Wickerhamomyces
anomalus*

Periódico: Water Research (A1)

Imobilização e atividade antimicrobiana de micocinas obtidas de *Wickerhamomyces anomalus*

Cristiane Persel¹, Rinaldo Ferreira Gandra^{1,2 *}

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

RESUMO

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura produtora de micocinas, estas substâncias são glicoproteínas secretadas por algumas leveduras e possuem ação antimicrobiana com amplo espectro de atividade. *Escherichia coli* é a bactéria predominante do grupo de coliformes, sua presença na água indica contaminação fecal, sendo utilizada como indicador em análises microbiológicas de água. Apesar de pertencer a microbiota humana e animal pode ser patogênica, causando diversos tipos de infecções. A imobilização de células e substâncias demonstra grande potencial de aplicação biotecnológica em diversas áreas. Desta maneira, este trabalho objetivou avaliar a atividade de micocinas livres e imobilizadas, obtidas de *W. anomalus*, frente as cepas de *E. coli* e coliformes fecais. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo para avaliar a ação das micocinas livres, em diferentes diluições, frente à 45 cepas multirresistentes de *E. coli* isoladas de amostras clínicas. As micocinas foram imobilizadas em diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio e testadas para verificar a atividade antimicrobiana frente à cepa de *E. coli* ATCC25922 e coliformes fecais presentes em amostras de água contaminadas com fezes. As micocinas foram capazes de inibir todas as cepas utilizadas na microdiluição em caldo, sendo que 100% das cepas foram inibidas pelas micocinas utilizadas puras e mesmo diluídas as micocinas apresentaram ação inibitória, a diluição de 1:2 inibiu 78,2% das cepas de *E. coli* multirresistentes. A concentração de alginato de sódio influenciou no formato dos grânulos obtidos na imobilização resultado não observado ao variar a concentração de cloreto de cálcio. As micocinas imobilizadas com alginato de sódio a 2% e CaCl₂ 0,2 mol/L apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente a cepa de *E. coli* ATCC25922. Os coliformes fecais foram inibidos pelas micocinas imobilizadas após 48h de incubação. Em síntese, neste estudo, as micocinas foram hábeis em inibir *E. coli* e coliformes presentes em amostras de água contaminada com fezes. Considerando a problemática de cepas multirresistentes a antibióticos e a necessidade de novas alternativas para melhorar a qualidade da água e efluentes de esgoto tais resultados demonstram uma possível aplicação como alternativa para agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Micocinas, *W. anomalus*, *E. coli*, imobilização, alginato de sódio, cloreto de cálcio.

*Autor correspondente.

E-mail: rinaldo.gandra@unioeste.br

1- Todos os autores contribuíram igualmente para o trabalho.

2- Endereço atual: Av. Tancredo Neves, 3224, Bairro Santa Cruz, Cascavel - PR, CEP: 85806-470, Brasil.

1. Introdução

As micocinas são glicoproteínas secretadas por algumas leveduras, estas substâncias possuem ação antimicrobiana causando a morte de microrganismos suscetíveis (Kurtzman; Fell; Boekhout, 2011; Capelli et al., 2014; Muccilli and Restuccia, 2015).

A produção de micocinas pode ser considerada como estratégia de sobrevivência no ambiente, a qual representa vantagem para a espécie de levedura produtora entre outras espécies no mesmo hábitat (Capelli et al., 2014) habilitando as leveduras produtoras serem grandes competidores e impedindo o desenvolvimento de outros microrganismos pela liberação de micocinas no meio (Stoll et al., 2005). Várias espécies dos demais gêneros de leveduras são relatadas como micocinogênicas, como por exemplo: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia* (Magliani et al., 1997; Pfeiffer et al., 2004; Silva et al., 2008; Buzdar et al., 2011; Bajaj et al., 2013; Capelli et al., 2014)

Wickerhamomyces anomalus, denominada antigamente por *Pichia anomala* e *Hansenula anomala*, é uma levedura pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae* (Kurtzman, Robnett and Basehoar-Powers (2008). Desenvolve-se facilmente em diferentes condições de temperatura, osmolaridade e pH, podendo ser isolada de insetos, plantas, animais, humanos, alimentos, solos e ambientes aquáticos. Algumas cepas desta levedura produzem micocinas que inibem o crescimento de vários microrganismos, tais como: leveduras, fungos filamentosos, bactérias e parasitas (Walker et al., 1995; Fredlund et al., 2002; Starmer and Lachance, 2011; Walker, 2011; Capelli et al., 2014; Valzano et al., 2016). Devido ao amplo espectro de atividade antimicrobiana e grande estabilidade, as micocinas de *W. anomalus* possuem aplicabilidade em processos da indústria alimentícia, biocontrole agrícola e na área clínica (Magliani et al., 1997; Passoth et al., 2006; Walker, 2011).

A qualidade microbiológica da água e de alimentos pode ser mensurada através da presença de indicadores bacterianos, os coliformes (Noble et al., 2003). Estes microrganismos são utilizados como parâmetro e são divididos em coliformes totais e fecais. Os coliformes fecais também denominados como termotolerantes, apresentam espécies de bactérias dos gêneros: *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (Kagkli et al., 2007).

Escherichia coli é a bactéria predominante do grupo de coliformes termotolerantes, sua presença na água significa contaminação fecal, devido a isto, é

considerada um indicativo determinante em testes de controle de qualidade microbiológica da água e efluentes (Weintraub, 2007; WHO, 2011). Esta bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é encontrada na microbiota intestinal, sendo eliminada nas fezes de humanos e de animais, pode ser categorizada como comensal, patogênica extraintestinal e enteropatogênica, causando diversas infecções. É também responsável por diversos surtos de diarreia, principalmente em crianças (Kaper et al., 2004; Lues et al., 2007; Atidéglá et al., 2016). Outro ponto relacionado à patogenicidade a *E. coli* é a resistência a antibióticos, desta maneira é de grande importância a descoberta de novas alternativas de agentes antimicrobianos para tratar e prevenir infecções por esta e outras bactérias (Chen et al 2015).

A imobilização de células e substâncias demonstra grande potencial de aplicação biotecnológica nas áreas industrial, de biocontrole, clínica e ambiental, sendo utilizada em várias pesquisas científicas (Khalil and Mansour, 2006; King et al., 2007; Hoesli et al, 2010; Bleve et al., 2011; Jayakumar et al., 2012; Aloui et al., 2015). Técnicas de imobilização celular ajudam a segregação de uma célula em um ambiente adverso (Westman et al., 2012) garantindo melhor resistência ao estresse e conseqüentemente um melhor desempenho (NEDOVIĆ et al., 2015).

Problemas relacionados com a contaminação de fontes hídricas são muito discutidos e enfatizados. Uma das consequências está relacionada com a transmissão de diversas doenças, devido à presença de microrganismos patogênicos na água. Devido ao uso exacerbado de antibióticos, muitas cepas podem se tornar multirresistentes aos tratamentos já utilizados. Para minimizar isto, novas alternativas de agentes antimicrobianos são necessárias. Desta maneira, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de micocinas livres e imobilizadas obtidas de *Wickerhamomyces anomalus* frente a diversas cepas de *E. coli* e coliformes fecais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos

Para este trabalho foi utilizada uma cepa da levedura *Wickerhamomyces anomalus* WA40 (número de acesso: KT580792, disponível no site

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Além de uma cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922, foram utilizadas 45 cepas multirresistentes de *E. coli* isoladas de diferentes amostras clínicas, (1 de secreção traqueal, 1 de secreção anal, 1 de secreção da uretra, 2 de secreção de abscesso, 2 de secreção peritoneal e 38 de urina). Estas cepas foram isoladas e identificadas em um hospital público em Cascavel, Paraná, Brasil. A avaliação do caráter de resistência foi realizada através do sistema automatizado Vitek®, as cepas apresentaram resistência a mais de um dos seguintes antibióticos: Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ácido clavulônico, Cefalotina, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Ceftriaxona, Cefepima, Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Nitrofurantoína e Trimetopim/Sulfametoxazol. O perfil de sensibilidade de cada cepa de *E. coli* está em anexo 1.

2.2. Obtenção de micocinas a partir do cultivo de *W. anomalus*

Para obtenção das micocinas foi utilizada a cepa WA40 de *W. anomalus* isolada do solo, pertencente a micoteca do laboratório de micologia, a mesma foi inoculada em ágar sabouraud modificado – ASM (2% de ágar; 1% de peptona; 2% de glicose; 1,92% de ácido cítrico e 3,48% de fosfato de potássio bibásico – pH 4,7) incubada a 31°C durante 48 horas. Após este período, uma suspensão de 10⁶ UFC/mL da levedura foi inoculada em 200 mL de caldo de crescimento constituído de: 1% de peptona; 2% de glicose; 1,92% de ácido cítrico e 3,48% de fosfato de potássio bibásico (pH 4,7). Os frascos foram incubados a 25°C por 5 dias em cultivo estático. Após este período, o caldo de crescimento foi centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos para obter o sobrenadante do caldo com micocinas produzidas pela levedura, em seguida o sobrenadante foi esterilizado por filtração através de membrana 0,22 µm e armazenado a 4°C até a realização dos testes *in vitro*.

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana das micocinas por microdiluição

A atividade antimicrobiana das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *W. anomalus* WA40 foi avaliada frente as cepas de *E. coli* ATCC25922 e as 45 cepas de *E. coli* multirresistentes. A suscetibilidade das 46 cepas bacterianas foi avaliada através do método de microdiluição em caldo descrito por *Clinical and Laboratory Standards Institute* – M07-A10 com algumas modificações. Suspensões

de cada cepa de *E. coli* foram preparadas em caldo Mueller-Hinton (MH) e ajustadas para obter uma concentração final de $1-9 \times 10^3$ UFC/mL. As micocinas obtidas do sobrenadante foram previamente submetidas a diluições seriadas: 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 em água estéril, além da utilização do sobrenadante puro. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços de fundo chato. Em cada um dos poços foram adicionadas alíquotas de 100 µl das suspensões de cada cepa de *E. coli* e 100 µl das micocinas. Um controle de crescimento foi preparado para cada cepa de *E. coli*, bem como um controle de esterilidade (200 µl de caldo MH). As placas foram incubadas a 35 ° C e após 48 h, foi realizada a leitura das mesmas, observando a presença ou ausência de crescimento visível como referência do controle de crescimento. Alíquotas de 10 µl dos poços em que não apresentaram turvação foram inoculadas em ágar nutriente para confirmar a ausência de crescimento. O teste foi realizado em triplicata.

2.4. Imobilização das micocinas

Para imobilização das micocinas foram utilizadas diferentes concentrações de alginato de sódio: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% (p/v), e cloreto de cálcio a 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mol/L.

Para cada concentração de alginato de sódio foram preparados frascos que continham 12,5 mL do sobrenadante com as micocinas e 12,5 mL de solução alginato de sódio, previamente esterilizado. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 15 minutos a 60 rpm e em seguida, gotejada em frascos que continham 100 mL de solução de CaCl_2 nas diferentes concentrações. Os mesmos foram mantidos sob agitação de 60 rpm para desenvolvimento de grânulos com as micocinas imobilizadas. Após o gotejamento de toda a solução de micocinas e alginato de sódio em cloreto de cálcio, os grânulos resultantes da imobilização foram mantidos sob agitação por mais 5 minutos e em repouso durante o mesmo tempo. As micocinas imobilizadas foram lavadas em água estéril três vezes para total remoção da solução de cloreto de cálcio. Após a imobilização, os grânulos resultantes foram avaliados, sendo verificado o peso, medida e aspecto físico dos mesmos.

2.5. Atividade antimicrobiana das micocinas imobilizadas frente à cepa de *E. coli*

A atividade das micocinas imobilizadas foi avaliada frente à bactéria *E. coli* ATCC25922. Uma suspensão em salina de *E. coli* de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL foi preparada e alíquotas de 10 μ L foram adicionadas em frascos com 50 mL de uma solução contendo 1% peptona e 1% de glicose, em um dos frascos foram adicionados 50 mL dos grânulos com micocinas imobilizadas e o outro frasco sem os grânulos, foi utilizado como controle positivo do crescimento bacteriano. Os frascos foram mantidos de forma estática a 35°C. Em seguida uma alíquota de 1 μ L de cada frasco foi inoculada em placas de ágar nutriente, incubados a 35°C por 24 horas, após foi realizada a contagem das UFC/mL.

2.6. Atividade antimicrobiana das micocinas imobilizadas frente a coliformes fecais

Para este experimento as micocinas foram imobilizadas utilizando alginato de sódio a 2% e cloreto de cálcio a 0,2 mol/L. O volume total dos grânulos resultantes da imobilização de micocinas nas condições acima citadas foi de 50 mL e foram acondicionados em sacos confeccionados de fios de nylon. Os sacos foram adicionados em frascos que continham água contaminada com fezes, incubados de forma estática a 35°C. Para cada amostra, um frasco contendo somente amostras de água contaminada com fezes foi utilizado como controle positivo do crescimento bacteriano e incubado nas mesmas condições. Retirou-se uma alíquota de 1 μ L de cada frasco sendo inoculada em placas de ágar MacConkey, incubados a 35°C por 24 horas. Após este período foi realizada a contagem das UFC/mL das diferentes colônias presentes em cada placa e comparadas com o crescimento das amostras dos frascos controle.

3. Resultados e discussão

3.1. Resultados

3.1.1. Atividade antimicrobiana das micocinas

No presente estudo a atividade antimicrobiana das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *W. anomalous* WA40 foi verificada por microdiluição em caldo. As micocinas apresentaram atividade inibitória sobre todas as cepas *E. coli* testadas, tanto para cepa padrão ATCC25922 quanto para as 45 cepas multirresistentes. Todas as cepas utilizadas foram sensíveis as micocinas quando utilizado o sobrenadante puro. A cepa padrão de *E. coli* ATCC25922 foi sensível a diluição de 1:8. As micocinas na proporção de 1:2 inibiram 78,2% das cepas de *E. coli*, conforme demonstrado na Figura 1.

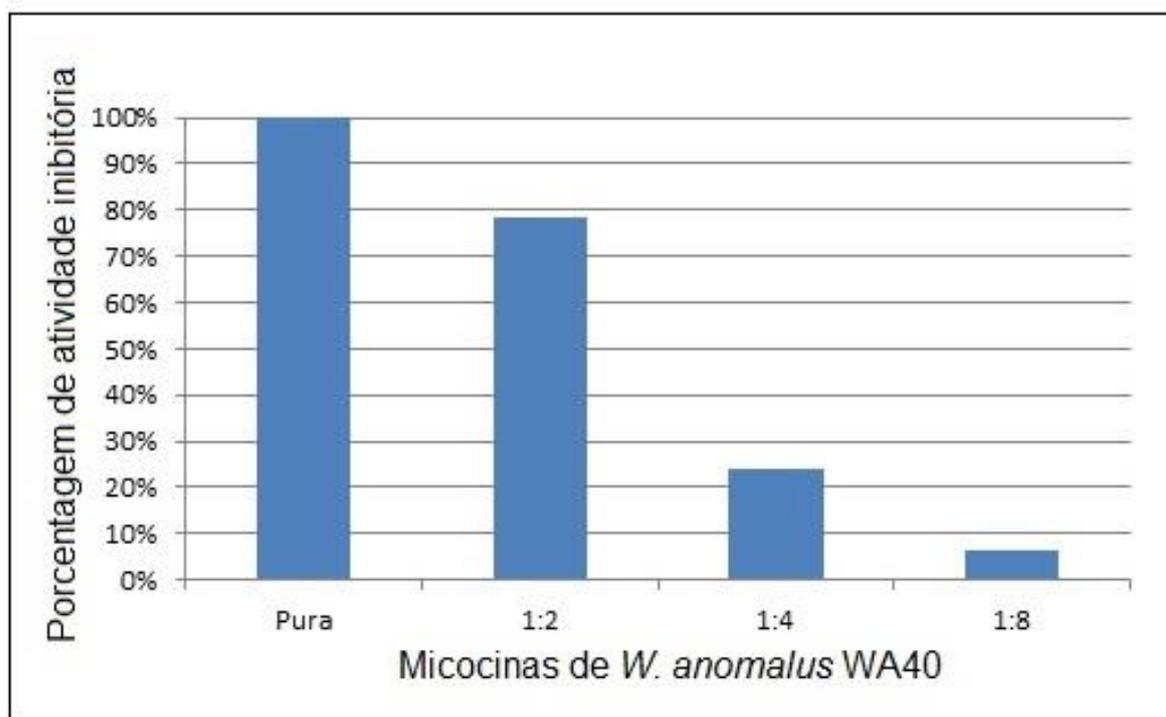


Figura 1: Suscetibilidade das cepas de *E. coli* frente as micocinas de *W. anomalous* WA40.

3.1.2. Imobilização das micocinas

Os grânulos resultantes da imobilização das micocinas com as diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio apresentaram peso médio de 0,075 g e diâmetro médio de 4,5 mm. O aspecto dos grânulos também foi avaliado, sendo que os grânulos da imobilização utilizando as concentrações de alginato de sódio a 2,0; 2,5 e 3,0% apresentaram melhores resultados, formando grânulos de formato esférico, uniforme e com superfície lisa conforme figura 2.

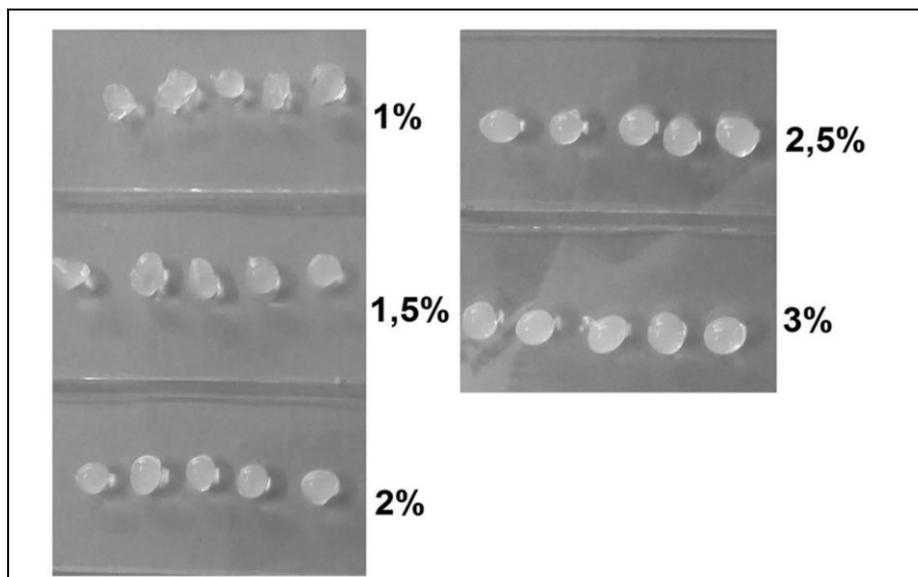


Figura 2: Imobilização de micocinas utilizando diferentes concentrações de alginato de sódio.

3.1.3. Atividade antimicrobiana de micocinas imobilizadas

As micocinas imobilizadas nas concentrações de 2% de alginato de sódio e 0,2 mol/L de cloreto de cálcio apresentaram melhor atividade inibitória sobre a cepa de *E. coli* ATCC25922, após 24 horas de incubação, o total UFC/mL da cepa *E. coli* ATCC25922 decresceu ao longo dos dias se comparado com o controle positivo de crescimento bacteriano. Após 8 dias de testes não foi verificado o crescimento bacteriano neste tratamento. Com as concentrações de cloreto de cálcio a 0,3 e 0,4 mol/L também apresentaram atividade inibitória, porém a ação das micocinas iniciou-se após 48 horas de incubação. As micocinas que foram imobilizadas utilizando o cloreto de cálcio nas concentrações de 0,05 e 0,1 mol/L apresentaram atividade inibitória mais tardia, conforme demonstrado na figura 3.

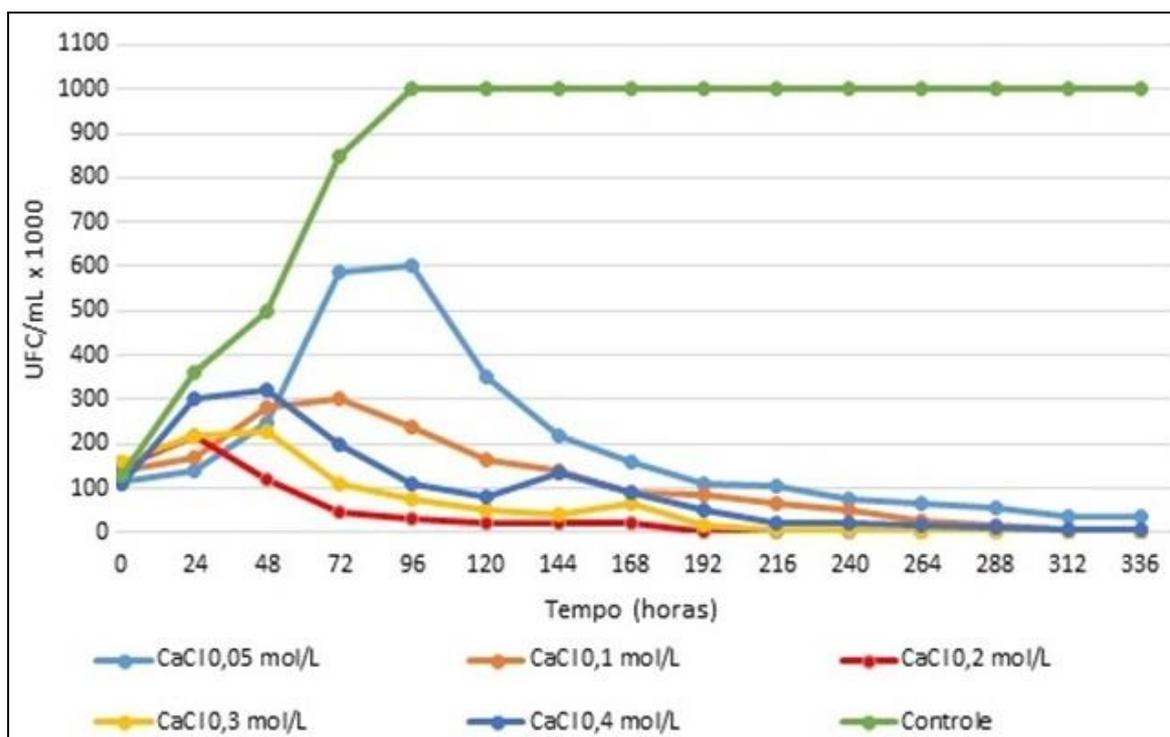


Figura 3: Atividade de micocinas immobilizadas frente à cepa de *E. coli* ATCC25922.

3.1.4. Atividade antimicrobiana das micocinas immobilizadas frente a coliformes fecais

As micocinas immobilizadas apresentaram atividade inibitória sobre os coliformes fecais em todas as amostras de água contaminada com fezes, após 24 h foi possível verificar diminuição do número de UFC/mL das placas inoculadas de cada amostra. No decorrer de 48 h não houve crescimento bacteriano nas placas de ágar quando comparado com o controle de cada amostra (Figura 4).

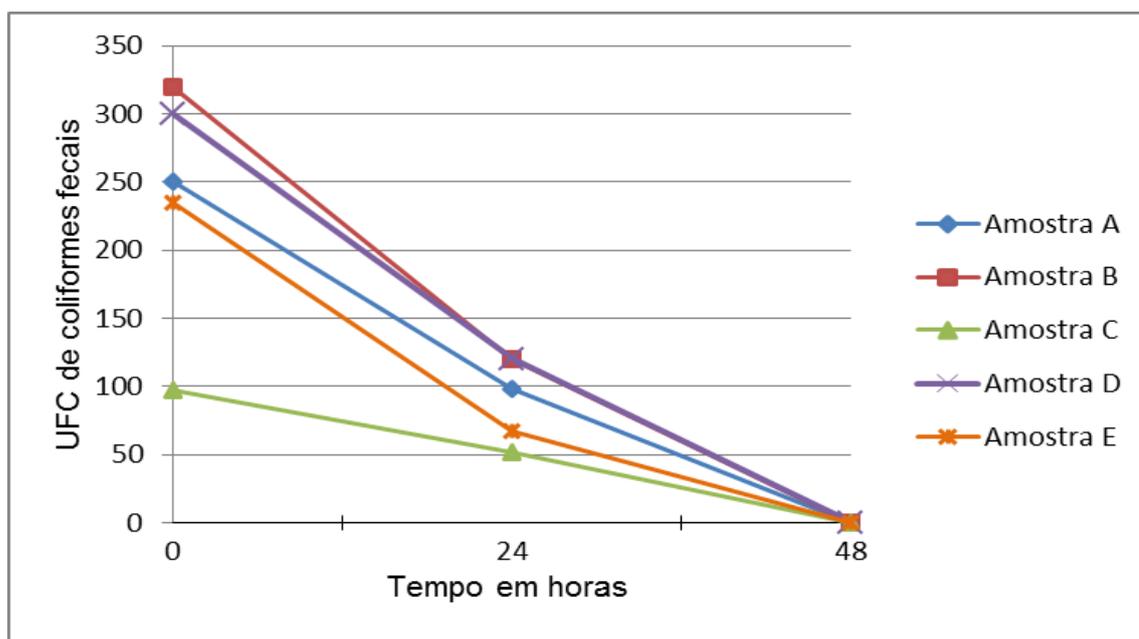


Figura 4: Atividade de micocinas imobilizadas frente a coliformes de amostras de água contaminada com fezes (Amostras A, B, C, D e E).

3.2. Discussão

A resistência aos antibióticos é um problema global e a ampla variedade de agentes infecciosos resistentes é uma ameaça crescente a saúde pública devido à rápida disseminação de bactérias multirresistentes pela água, tais como *E. coli* (WHO, 2015).

No presente estudo, todas as cepas de *E. coli* multirresistentes foram sensíveis a ação das micocinas de *W. anomalous* WA40, este efeito também foi verificado sobre a cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922, utilizadas nos testes de microdiluição em caldo em diferentes proporções (Figura 1).

Olstorpe et al. (2012), utilizaram células íntegras de *H. anomala* contra várias espécies de enterobactérias e ao longo dos dias de tratamento verificaram uma redução do número de UFC das cepas de *E. coli* na presença da levedura.

Paris et al. (2016), utilizaram micocinas produzidas por *W. anomalous* WA40 e verificaram a ação destas frente as cepas de *Candida albicans*, os autores observaram que todas as cepas testadas foram inibidas. As micocinas são mais ativas contra outras leveduras, porém apresentam comportamento antagônico a outros microrganismos, como bactérias (Comitini et al., 2005; Meneghin et al., 2010), podendo assim serem empregadas como uma alternativa de agente antimicrobiano.

Resultados da ação inibitória de micocinas sobre cepas de *E. coli* foram obtidos por Chen et al. (2015), os quais utilizaram as micocinas de duas linhagens de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

Considerando que os estudos de compostos antimicrobianos secretados por leveduras estejam ainda numa fase de desenvolvimento, explorar e elucidar a atividade de tais compostos que são produzidos por estes microrganismos é de fato uma estratégia para encontrar novos candidatos a antibióticos (Hatoum; Labrie; Fliss, 2012; Svahn et al., 2012).

Segundo Covizzi et al. (2007), a imobilização microbiana oferece muitas vantagens, tais como: elevada concentração de imobilizado, uma melhor resistência à contaminação, a estimulação da produção e secreção de metabólitos secundários além da proteção física e química das células e compostos bioativos.

Alginato é um dos polímeros mais utilizados para imobilização de células e enzimas devido as suas características: fácil manuseio, propriedades atóxicas, biocompatibilidade, disponibilidade e baixo custo (Gombotz and Wee, 1998; Kawaguti and Sato, 2008; Westman et al., 2012; Duarte et al., 2013). Desta maneira, a imobilização utilizando este polímero não afeta o desempenho e atividade do imobilizado.

As micocinas imobilizadas neste trabalho apresentaram atividade antimicrobiana frente a *E.coli* e bactérias presentes em água contaminada com fezes. Para Elizei et al., (2014), o método de imobilização utilizando alginato de sódio não afeta os processos biológicos das células microbianas, por se tratar de um polímero atóxico. Segundo Kawaguti e Sato (2008), a atividade das células imobilizadas dependerá do tamanho da superfície das esferas, da porosidade do gel formado e das características hidrofílicas do suporte.

Para Goh et al. (2012) e Gombotz e Wee (1998), o fator que determina o diâmetro médio das esferas é o tamanho do bico de extrusão, concentração e viscosidade do alginato de sódio utilizado. Os grânulos resultantes da imobilização das micocinas apresentaram variações em relação ao aspecto físico conforme as diferentes concentrações de alginato de sódio utilizadas, resultado não observado ao variar as concentrações de cloreto de cálcio, as quais influenciaram no início da atividade inibitória das micocinas imobilizadas. Won et al. (2005), relataram que as diferentes concentrações de cloreto de cálcio não afetaram o imobilizado, somente a variação da concentração de alginato de sódio. Neste trabalho diferentes concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio foram utilizadas e os resultados obtidos estão de acordo com outras pesquisas científicas, de modo que, ao variar as concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio houve diferenças

no aspecto físico e atividade do material imobilizado (Becerra et al., 2011; Quiroga et al., 2011; Andriani et al., 2012; Rehman et al., 2013).

A transmissão de doenças pela água é a principal causa de mortes em muitos países, havendo uma urgência de avaliação dos métodos de desinfecção considerando a necessidade de novas abordagens para melhoria nos processos (Li et al., 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde, novas alternativas para tratar águas e efluentes, com o intuito de remover a carga microbiana indicadora de poluição fecal, vêm sendo pesquisadas, já que os efeitos que estes microrganismos podem causar a população são considerados de grande importância, levando em conta, principalmente, a veiculação de doenças através da água afetando assim, diretamente a saúde pública (WHO, 2011).

As leveduras produtoras de micocinas possuem características que possibilitam a aplicação em vários processos biotecnológicos ligados a alimentos, rações, biopreservação, fermentação e tratamento de águas residuais (Marquina et al., 2002; Starmer and Lachance, 2011; Walker, 2011; Schneider et al., 2012).

A levedura *W. anomalus* se desenvolve facilmente em diferentes condições de temperatura, osmolaridade e pH desta maneira tais características a tornam candidata para biorremediação em águas contaminadas (Fredlund et al., 2002; Walker, 2011). Técnicas de imobilização utilizando microalgas e bactérias têm sido estudadas em pesquisas científicas como uma alternativa de tratamento de água contaminada e esgoto (Covarrubias et al., 2011; Cruz et al., 2013).

No presente trabalho, as micocinas de *W. anomalus* WA40 imobilizadas utilizando alginato de sódio como polímero inibiram o desenvolvimento de bactérias presentes na água contaminada com fezes. Aloui et al. (2015), verificaram que células íntegras de *W. anomalus* imobilizadas em biofilmes do alginato de sódio apresentaram atividade antimicrobiana total sobre o crescimento de *Penicillium digitatum*. Desta maneira, podemos sugerir que a imobilização não afeta a ação que esta levedura apresenta, seja imobilizando a levedura ou as micocinas que a mesma produz.

Considerando a técnica de imobilização em alginato e a ação das micocinas de *W. anomalus*, os resultados obtidos neste trabalho mostram que as micocinas obtidas de *W. anomalus* WA40 apresentaram atividade antimicrobiana sobre diversas cepas de *E. coli* e coliformes fecais, mesmo estando imobilizadas, desta maneira a imobilização de micocinas seria uma possível alternativa para tratamento de águas contaminadas com material fecal.

4. Conclusão

Concluimos com este trabalho que as micocinas produzidas pela cepa de *W. anomalus* WA40 foram capazes de inibir cepas multirresistentes de *E. coli* além da cepa padrão *E. coli* ATCC 25922.

Ao variar a concentração de alginato de sódio houve alteração no aspecto físico dos grânulos resultantes da imobilização de micocinas e resultado não observado ao variar as concentrações de cloreto de cálcio.

As micocinas imobilizadas apresentaram atividade inibitória frente à cepa padrão *E. coli* ATCC 25922, quando imobilizadas nas concentrações de 2% de alginato de sódio e 0,2 mol/L de cloreto de cálcio a atividade inibitória teve início após 24 h de incubação. Nestas condições de imobilização, as micocinas imobilizadas também apresentaram ação antibacteriana frente a coliformes presentes nas amostras de água contaminada com fezes, neste experimento todas as amostras não apresentaram crescimento de bactérias após 48 h de teste.

As micocinas obtidas de *W. anomalus* WA40 foram hábeis em inibir *E. coli* e bactérias presentes em água contaminada com material fecal, seja utilizando estas substâncias na forma livre ou imobilizada.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não conflito de interesse.

Agradecimentos

Unioeste, Capes e Fundação Araucária.

Referências

Aloui, H.; Licciardello, F.; Khaoula, K.; Hamdi, M.; Restuccia, C., 2015. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. International Journal of Food Microbiology, 200, 22-30. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.015>.

Andriani, D.; Sunwoo, C.; Ryu, H.; Prasetya, B.; Park, D., 2012. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. Bioprocess Biosyst Eng, 35 (1-2), 29-33. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0630-z>.

Atidégla, S.C.; Huat, J.; Agbossou, E.K.; Saint-Macary, H. Kakai, R.G., 2016. Vegetable Contamination by the Fecal Bacteria of Poultry Manure: Case Study of Gardening Sites in

Southern Benin. *International Journal of Food Science*, 2016, 1-8. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4767453>.

Bajaj, B.K.; Raina, S.; Singh, S., 2013. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53 (8), 645-656. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200187>.

Becerra, M.; Baroli, B.; Fadda, A.M.; Blanco Méndez, J.; González Siso, M., 2001. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (8-9), 506-512. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(01\)00409-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(01)00409-4).

Bleve, G.; Lezzi, C.; Chiriatti, M.A.; D'Ostoni, I.; Tristezza, M.; Di Venere, D.; Sergio, L.; Mita, G.; Grieco, F., 2011. Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. *Bioresource Technology*, 102 (2), 982-989. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.059>.

Buzdar, M.A.; Chi, Z.; Wang, Q.; Hua, M.; Chi, Z., 2011. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91 (6), 1571-1579,. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3220-8>.

Cappelli, A.; Ulissi, U.; Valzano, M.; Damiani, C.; Epis, S.; Gabrielli, M.G.; Conti, S.; Polonelli, L.; Bandi, C.; Favia, G.; Ricci, I., 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. *Plos One*, 9, (5), 1-9. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095988>.

Chen, Y.; Aorigele, C.; Wang, C.; Simujide, H.; Yang, S., 2015. "Screening and Extracting Mycocin Secreted by Yeast Isolated from Koumiss and Their Antibacterial Effect." *Journal of Food and Nutrition Research*, 3 (1), 52-54. DOI: 10.12691/jfnr-3-1-9.

CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition*. CLSI document M07-10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

Comitini F.; Ferretti R.; Clementi F.; Mannazzu I.; Ciani M., 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (1), 105-111. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02579.x>.

Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M. Bashan, Y., 2012. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 2669. doi:10.1007/s00253-011-3585-8

Covizzi, L.G.; Giese, E. C.; Gomes, E.; Dekker, R. F. H.; Da Silva, R., 2007. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciência Exatas e Tecnológicas*, 28, (2), 143-160. D.O.I.: 10.7198/S2237-0722201500030007

Cruz, I., Bashan, Y., Hernández-Carmona, G., de Bashan, L.E., 2013. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 9847. doi:10.1007/s00253-013-4703-6

Duarte, J.C., Rodrigues, J.A.R., Moran, P.J.S., Valença, G.P., Nunhez, J.R., 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3, (31), 1-30. <http://doi.org/10.1186/2191-0855-3-31>.

Eldin, M.S.; Seuror, E.I.; Nasr, M.A.; Tieama, H.A., 2011. Mohy et al. Affinity Covalent Immobilization of Glucoamylase onto p-Benzoquinone-Activated Alginate Beads: II. Enzyme

Immobilization and Characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, (1), 45-57. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-9113-y>.

Elizei, V.G.; Reis, V.R.; Ceccato-Antonini, S.R., 2014. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. *Arq. Inst. Biol.*, 81, (2), 165-172. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001032012>.

Fredlund, E.; Druvefors, U.; Boysen, M.E.; Lingsten, K.J.; Schnurer, J., 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast J121. *Fems Yeast Research*, 2 (3), 395-402. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s1567-1356\(02\)00098-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1567-1356(02)00098-3).

Goh, C.H.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W., 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88 (17), 1-12. doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.012

Gombotz, W.; Wee, S, 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31 (3), 267-285. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(97\)00124-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(97)00124-5).

Hatoum, R.; Labrie, S.; Fliss, I., 2012. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. *Frontiers In Microbiology*, 3: 1-12. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>.

Hoesli, C.A.; Raghuram, K.; Kiang, R.L.J.; Mocinecová, D.; Hu, X.; Johnson, J.D.; Lacík, I.; Kieffer, T.J.; Piret, J.M., 2010. Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation. *Biotechnol. Bioeng.*, 108 (2), 424-434. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22959>.

Jayakumar, R. Amrita, N.; Sanoj, R.N.; Maya, S.; Nair, S.V.I., 2012. Doxorubicin-loaded pH-responsive chitin nanogels for drug delivery to cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 87 (3), 2352-2356. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.040>.

Kağkli, D.M.; Vancanneyt, P.; Hill, C.; Cogan, T.M., 2007. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (5), 1393-1405. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03338.x>.

Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), 123-140. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>.

Kawaguti, H.Y.; Sato, H.H., 2008. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. *Química Nova*, 31 (1), 134-143. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100025>

Khalil, A.H.; Mansour, E.H., 2006. Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise. *Journal of Food Science*, 63 (4), 702-705. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15817.x>.

King, V.A.; Huang, H. Tsen, J., 2007. Fermentation of tomato juice by cell immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Mid-Taiwan Journal of Medicine*, 12 (1), 22-30.

Kurtzman, C.P.; Robnett, C. J.; Basehoar-Powers, E., 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *Fems Yeast Research*, [s.l.], v. 8, n. 6, p.939-954. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x>.

- Kurtzman, C.P.; Fell, J.E.; Boekhout, T., 2011. Definition, classification and Nomenclature of the Yeasts, *In* "The Yeasts" A Taxonomic Study, 5. Ed. Londres, Elsevier Science, p. 03-05.
- Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D.Y.; Brunet, L.; Liga, M.V.; Li, D.; Alvarez, P.J.J., 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 42 (18), 4591-4602. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015>.
- Lues, J. F. R.; Theron, M.M.; Venter, P. Rasephei, M.H.R., 2007. Microbial Composition in Bioaerosols of a High-Throughput Chicken-Slaughtering Facility. *Poultry Science*, 86 (1), 142-149. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ps/86.1.142>.
- Magliani, W.; Conti, S.; Gerloni, M.; Bertolotti, D.; Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (3), 369–400.
- Marquina, D.; Santos, A.; Peinado, J., 2002. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*, 5 (2), 65-71. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>.
- Meneghin, M.C; Reis, V.R.; Ceccato-Antonini, S.R., 2010. Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53 (5), 1043-1050. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132010000500006>.
- Muccilli, S.; Restuccia, C., 2015. Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, 3 (4), 588-611. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms3040588>.
- Nedović, V.; Gibson B.; Mantzouridou, T.F.; Bugarski, B.; Djordjević, V.; Kalušević, A.; Paraskevopoulou, A.; Sandell, M.; Šmogrovičová, D.; Yilmaztekin, M., 2015. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast*, 32 (1), 173-213. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3042>.
- Noble, R.T.; Moore, D.F.; Leecaster, M.K.; McGee, C.D.; Weisberg, S.B., 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research*, 37 (7), 1637-1643. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00496-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00496-7).
- Olstorpe, M.; Schnurer, J.; Passoth, V., 2011. Growth Inhibition of Various *Enterobacteriaceae* Species by the Yeast *Hansenula anomala* during Storage of Moist Cereal Grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (1), 292-294. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.06024-11>.
- Paris, A.P; Persel,C.; Serafin, C.F.; Simão, R.C.G; Gandra,R.F., 2016. Susceptibility of *Candida albicans* isolated from blood to *Wickerhamomyces anomalus* mycocins. *Curr. Microbiol.*, 73(6): 878-884. doi: 10.1007/s00284-016-1135-4.
- Passoth, V.; Fredlund, E.; Druvefors, U. Ä.; Schnürer, J., 2006. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6 (1), 3–13. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x
- Pfeiffer, U.; Golubev, W.I.; Farkas, Z.; Kucsera, J.; Golubev, N., 2004. Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86 (4), 369-375. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-004-0888-0>.
- Polonelli, L.; Morace, G., 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J. Clin. Microbiol.* 24: 866–869. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/24/5/866.long>>

- Quiroga, E.; Illanes, C.O.; Ochoa, N.A.; Barberis, S., 2011. Performance improvement of araujain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. *Process Biochemistry*, 46 (4), 1029-1034. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.012>.
- Rehman, H.U.; Aman, A.; Silipo, A.; Qader, S.A.U.; Molinaro, A.; Ansari, A., 2013. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, 139 (1-4), 1081-1086. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.069>.
- Schneider, J.; Rupp, O; Trost, E.; Jaenicke, S.; Passoth, V.; Goesmann, A.; Tauch, A.; Brinkrolf, K., 2012. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *Fems Yeast Research*, 12 (3), 382-386. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x>.
- Silva, S.; Calado, S.; Lucas, C.; Aguiar, C., 2008. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiological Research*, 163 (2), 243-251. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2007.04.002>.
- Starmer, W.T.; Lachance, M.A.T., 2011. In "The Yeasts": A taxonomic study", Kurtzman, C.P.; Fell, J.W; Boekhout, 5^a ed., Londres, Elsevier Science, 2011. Cap. 6, V. 01, p. 65-83.
- Stoll, M.; Begerow, D.; Oberwinkler, F., 2005. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycological Research*, 109 (3), 342-356. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s0953756204002229>.
- Svahn, K. S.; Göransson, U.; El-Seedi, H.; Bohlin, L.; Larsson, D. G. J.; Olsen, B., Chryssanthou, E. Antimicrobial activity of filamentous fungi isolated from highly antibiotic-contaminated river sediment. *Infection Ecology & Epidemiology*, 2:1-6. Co-Action Publishing. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v2i0.11591>
- Walker, G.M.; McLeod, A.H.; Hodgson, V.J., 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *Fems Microbiology Letters*, 127 (3), 213-222.
- Walker, G.M., 2011. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99 (1), 25-34. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>.
- Weintraub, A., 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology*, 56 (1), 4-8. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46930-0>.
- Westman, J.O.; Taherzadeh, M.J.; Franzén, C.J., 2012. Proteomic Analysis of the Increased Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Encapsulated in Liquid Core Alginate-Chitosan Capsules. *Plos One*, 7(11), 1-12. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049335>.
- World Health Organization - WHO, 2011. *Guidelines for drinking-water quality*. 4. ed. Geneva: WHO, 2011. 564 p.
- World Health Organization – WHO, 2015. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation*. Geneva: WHO, 2015. 36p.
- Won, K.; Kim, S.; Kim, K.; Park, H.; Moon, S., 2005. Optimization of lipase entrapment in Calcium alginate gel beads. *Process Biochemistry*, 40 (6), 2149-2154. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.014>.

Valzano, M.; Cecarini, V.; Capelli, A.; Capone, A.; Bozic, J.; Cuccioloni, M.; Epis, S.; Petrelli, D.; Angeletti, M.; Eleuteri, A.M.; Favia, G.; Ricci, I., 2016. A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. *Malar J*, 15 (1), 1-9. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-1059-7>.

CONCLUSÕES GERAIS

Concluimos com este trabalho, que as micocinas produzidas pela cepa de *W. anomalus* WA40 foram capazes de inibir cepas multirresistentes de *E. coli* além da cepa padrão *E. coli* ATCC 25922.

Ao variar a concentração de alginato de sódio, houve alteração no aspecto físico dos grânulos resultantes da imobilização de micocinas e resultado não observado ao variar as concentrações de cloreto de cálcio.

As micocinas imobilizadas apresentaram atividade inibitória frente à cepa padrão *E. coli* ATCC 25922, quando imobilizadas nas concentrações de 2% de alginato de sódio e 0,2 mol/L de cloreto de cálcio, a atividade inibitória teve início após 24h de incubação. Nestas condições de imobilização, as micocinas imobilizadas também apresentaram ação antibacteriana frente a coliformes presentes nas amostras de água contaminada com fezes, neste experimento todas as amostras não apresentaram crescimento de bactérias após 48h de teste.

As micocinas obtidas de *W. anomalus* WA40 foram hábeis em inibir *E. coli* e bactérias presentes em água contaminada com material fecal, seja utilizando estas substâncias na forma livre ou imobilizada.

Este é o primeiro trabalho descrito sobre a atividade de micocinas imobilizadas com ação direta em coliformes fecais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi demonstrada uma possibilidade real de aplicação de micocinas imobilizadas para tratamento de água contaminada com coliformes fecais.

ANEXO 1: Perfil de sensibilidade das cepas de *E. coli* utilizadas no presente trabalho

CEPA <i>E. coli</i>	PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	SENSIBILIDADE ÀS MICOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE <i>W.</i> <i>anomalus</i> WA40 (DILUIÇÕES)
EC01	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC02	AMP, TRI/SULF	1:4
EC03	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	1:8
EC04	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, ANAD, CIPRO, NORF	1:2
EC05	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	1:2
EC06	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, CIPRO, GEN, AMP/SUL	1:2
EC07	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC08	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:4
EC09	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC10	AMP, TRI/SULF	1:4
EC11	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, ANAD, CIPRO, NORF	1:4
EC12	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, ANAD, CIPRO, NORF, AMO/ACL	1:2
EC13	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	1:4
EC14	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	PURA
EC15	AMP, ANAD	1:8
EC16	AMP, TRI/SULF	1:8
EC17	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC18	AMP, TRI/SULF	1:2
EC19	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR,	1:2

	CEFE, CEFTA, AMP/TAZ	
EC20	AMP, ANAD	1:2
EC21	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC22	AMP, TRI/SULF	1:2
EC23	AMP, TRI/SULF	1:2
EC24	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC25	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	PURA
EC26	AMP, TRI/SULF	PURA
EC27	AMP, TRI/SULF	1:4
EC28	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	1:2
EC29	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF, GEN	PURA
EC30	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC31	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, CEFTA, AMP/TAZ	PURA
EC32	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	1:2
EC33	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, CEFA, AMP/ACL, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC34	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, GEN	PURA
EC35	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF, NITR	1:2
EC36	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	1:2
EC37	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	1:2
EC38	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, ANAD, CIPRO, NORF, AMO/ACL	1:2

EC39	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	PURA
EC40	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, CIPRO, GEN, AMP/SUL	1:2
EC41	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, CEFTA, ANAD, TRI/SULF	PURA
EC42	AMP, TRI/SULF	1:4
EC43	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF	PURA
EC44	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, ANAD, CIPRO, NORF	1:8
EC45	AMP, CEFA, CEFU, CEFUA, CEFTR, CEFE, ANAD, CIPRO, NORF, TRI/SULF	PURA
ATCC25922	-	1:8

Legenda: AMO/ACL: Amoxilina/Ácido Clavulônico; AMP: Ampicilina; AMP/SUL: Ampicilina/Sulbactam; AMP/TAZ: Ampicilina/Tazobactam; ANAD: Ácido nalidixico; CEFA: Cefalotina; CEFE: Cefepima; CEFTR: Ceftazidima; CEFU: Cefuroxima; CEFUA: Cefuroxima Axetil; CIPRO: Ciprofloxacina; GEN: Gentamicina; NITR: Nitrofurantoína; NORF: Norfloxacina; TRI/SULF: Trimetoprim/Sulfametoxazol.