

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

PRISCILA RIBEIRO JANKOSKI

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE ÁREAS ÚMIDAS QUANTO À
PRODUÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Porto Alegre
Agosto/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Priscila Ribeiro Jankoski
Bacharela em Ciências Biológicas/ Unilasalle

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE ÁREAS ÚMIDAS QUANTO À
PRODUÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre
Agosto/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Jankoski, Priscila Ribeiro
PROSPECÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE ÁREAS
ÚMIDAS QUANTO À PRODUÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA / Priscila Ribeiro
Jankoski. -- 2018.
60 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agricultural e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Áreas úmidas. 2. Atividade antimicrobiana. 3.
Compostos bioativos. 4. Purificação parcial. 5.
Bacteriocinas. I. da Motta, Amanda de Souza, orient.
II. Título.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha **família** por todo o apoio e incentivo que sempre recebi. Em especial à minha mãe **Tânia**, ao meu padrinho **Luís** e a minha irmã **Camila**, por acreditarem no meu potencial e por terem me incentivado a chegar até aqui! Muito obrigada! Amo vocês! Ao meu namorado **Fabiano Coeli**, agradeço por toda ajuda e incentivo neste período, pela compreensão em todos os momentos nos quais tive que me ausentar por causa da pesquisa, por todas as caronas até o ICBS, principalmente nos finais de semana. Obrigada amore! Amo você! A minha irmã do coração, **Taís da Silva Barden** muito obrigada por estar sempre comigo, me apoiando em todos os momentos, por todo o companheirismo, carinho e amizade de sempre! Amo tu!

À minha orientadora Profa. Dra. **Amanda de Souza da Motta**, muito obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo crescimento tanto profissional como pessoal que tive ao longo desses dois anos.

Ao meu amigo do coração, **Mateus Camboim de Oliveira**, muito obrigada por toda a ajuda, pelo apoio e carinho, desde a época da graduação sempre estive ao meu lado. Obrigada pelas inúmeras vezes que você me escutou e aconselhou-me. Obrigada por tudo, meu bem!

Obrigada a Secretaria Municipal de Meio Ambiente de São Leopoldo e em especial aos biólogos **Natasha Comassetto**, **Vitória Viel**, **Hoeslen Mauzer** e **Julian Mauhs** do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina que me ajudaram e me acompanharam nas coletas. Um agradecimento especial as minhas amigas biólogas **Natasha** e **Vitória** que muito me ajudaram durante a minha passagem pela Secretaria de Meio Ambiente de São Leopoldo. Vocês são motivo de inspiração, pelo comprometimento e amor pela Natureza!

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório 222-C, obrigada por todo o auxílio, pelos momentos de diversão e ajuda nas coletas. Em especial ao **Alberto**, **Francielle**, **Tiela** e **Letícia** por me acompanharem nas coletas e por aceitarem entrar em um banhado com água até a cintura em um dia frio, hehe. **Fran**, obrigada pela parceria e por estar sempre disposta a ajudar todos a sua volta. Obrigada pelas idas até São Leopoldo para fazer as coletas. **Alberto**, obrigada por todas as vezes que ficaste comigo até tarde no laboratório me fazendo companhia, por revisar meus dados e me ajudar na

formatação deste trabalho! Obrigada pela amizade e companheirismo fora do laboratório também, pelos momentos de festa e descontração.

As minhas amigas lindas, **Jéssica Kurtz** que sempre esteve comigo desde a época da Biologia, obrigada pela parceria, pelas risadas, ajuda e amizade de sempre, pelos momentos de diversão dentro e fora do laboratório, pelos nossos almoços no RU e pelos cafés. Muito obrigada por sempre estar ao meu lado me escutando, me aconselhando e sempre com alguma palavra de ânimo quando eu precisei! Obrigada Jéssica por tudo! Agradeço a minha amiga **Luciani Cavalini**. Lu, obrigada por toda a parceria, pela amizade e carinho que você sempre demonstrou ter por mim. Obrigada por ter dividido momentos importantes comigo! Amizade que vai além da UFRGS. Amizade pra vida! Mais uma vez muito obrigada por tudo! **Tiela Trapp** e **Leticia Costa** muito obrigada pela amizade e parceria de sempre. Obrigada por todos os bons momentos que passamos juntas. Gurias, obrigada por todas as palavras de conforto e por terem colocado luz no meu caminho, quando tudo parecia estar perdido.

Tiela obrigada por todo o incentivo e confiança que você sempre depositou em mim! Obrigada por ser essa pessoa forte e determinada a quem eu me espelho e por vibrar com as minhas conquistas!! **Leticia**, agradeço por estar ao meu lado nas horas em que chorei e nas horas que sorri, foi maravilhoso encontrar tua mão estendida quando precisei...Talvez não existam palavras suficientes para lhe agradecer por todo apoio e amizade, que pra mim foram de valor inestimável! Obrigada por ser essa pessoa com essa energia maravilhosa e por transmitir isso às pessoas a sua volta.

Agradeço ainda ao prof. **Adriano Brandelli** e a equipe do laboratório 218 – ICTA, em especial ao amigo **Diego Bertolini** por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

A professora e amiga **Ana Paula Folmer Côrrea**, por toda ajuda, amizade e colaboração neste trabalho.

A funcionária **Eladir Rodrigues**, por toda ajuda quando precisei.

E por fim agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

PROSPECÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE ÁREAS ÚMIDAS DO PARQUE MUNICIPAL IMPERATRIZ LEOPOLDINA, SÃO LEOPOLDO/RS, QUANTO À PRODUÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Autor: Priscila Ribeiro Jankoski

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Amanda de Souza da Motta

RESUMO

As áreas úmidas são ecossistemas ricos em biodiversidade, abrigando uma variedade de espécies e sua importância ecológica é reconhecida em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi pesquisar isolados bacterianos a partir de amostras de sedimento da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS e estudar substâncias com atividade biológica por elas produzidas. As linhagens bacterianas foram identificadas através do Maldi-tof, testadas quanto à produção de enzimas hidrolíticas e de substâncias com atividade antimicrobiana. Para avaliação das propriedades enzimáticas, dos 37 isolados selecionados, 64% apresentaram resultado positivo para o teste da amilase, 16% para gelatinase, 37% para lipase e 91% para protease. Diante desses resultados, os seis isolados bacterianos que apresentaram melhor perfil enzimático foram selecionados para o teste da sobrecamada, observando-se a presença de halos de inibição em apenas um isolado *Bacillus* sp. sed 2.2 contra a indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Este isolado foi selecionado e a substância antimicrobiana por ele produzida foi parcialmente purificada através da precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-100) e membrana de ultrafiltração. Esta substância foi ativa contra algumas espécies de *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Em conclusão, os isolados obtidos de amostras de sedimento são fontes importantes de compostos bioativos, incluindo enzimas e peptídeos antimicrobianos, que podem apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas importantes.

Palavras-chave: Áreas úmidas, atividade antimicrobiana, *Bacillus* sp., compostos bioativos, enzimas hidrolíticas.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (60 p.) agosto, 2018.

PROSPECTING BACTERIAL ISOLATES FROM THE WETLANDS OF THE MUNICIPAL IMPERATRIX PARK LEOPOLDINA, SÃO LEOPOLDO / RS, ON THE PRODUCTION OF NEW MOLECULES WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Author: Priscila Ribeiro Jankoski

Advisor: Prof.^a. Dr.^a: Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

Wetlands are ecosystems rich in biodiversity, housing a variety of species and their ecological importance is recognized worldwide. The objective of this study was to investigate bacterial isolates from sediment samples from the Imperatriz Leopoldina Conservation Unit in São Leopoldo / RS and to study substances with biological activity produced by them. The bacterial strains were identified through Maldi-tof, tested for the production of hydrolytic enzymes and substances with antimicrobial activity. For the evaluation of the enzymatic properties of the 37 isolates selected (100%), 64% presented positive results for the amylase test, 16% for gelatinase, 37% for lipase and 91% for protease. In view of these results, the six bacterial isolates that presented the best enzymatic profile were selected for the overlay test, with the presence of inhibition halos in only one isolate *Bacillus* sp. sed 2.2 against the indicator *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. This isolate was selected and the antimicrobial substance it produced was partially purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration liquid chromatography (Sephadex G-100) and ultrafiltration membrane. This substance was active against some species of *Listeria*, including *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. In conclusion, the isolates obtained from sediment samples are important sources of bioactive compounds, including antimicrobial enzymes and peptides, which may exhibit antimicrobial activity against important pathogenic bacteria.

Keywords: Wetlands, antimicrobial activity, *Bacillus* sp., bioactive compounds, hydrolytic enzymes.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (60 p.) August, 2018.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivos Específicos	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 Áreas úmidas	3
3.2 Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina (PNMIL).....	4
3.3 Comunidades microbianas em ambientes de áreas úmidas	4
3.4 Substâncias bioativas produzidas por micro-organismos ambientais	7
3.4.1 Enzimas extracelulares produzidas por bactérias	7
3.4.2 Produção de substâncias com atividade antimicrobiana.....	8
3.5 Aplicação das bacteriocinas produzidas por isolados bacterianos ambientais.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Área de Estudo.....	14
4.1.1 Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina.....	14
4.1.2 Coleta das amostras de sedimento	14
4.2 Análises físico-químicas das amostras de sedimento	15
4.3 Contagem total das bactérias heterotróficas das amostras de sedimento	15
4.4 Caracterização preliminar e identificação por <i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight</i> (Maldi-Tof/MS) dos isolados bacterianos	16
4.5 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados bacterianos.....	17
4.5.1 Prova da amilase.....	17
4.5.2 Prova da atividade proteolítica	17
4.5.3 Produção de gelatinase.....	17
4.5.4 Prova da lipase	18
4.6 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelas bactérias selecionadas... 18	
4.6.1 Teste da sobrecamada.....	18
4.6.2 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas pelo Método de Difusão em Ágar com Discos	19
4.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA	19
4.7.1 Extração do DNA total.....	19
4.7.2 Amplificação do gene 16S rRNA.....	20

4.7.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA	20
4.8 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas em diferentes meios de cultivo	21
4.9 Curva de crescimento do isolado bacteriano <i>Bacillus</i> sp sed 2.2 e produção da substância antimicrobiana	21
4.10 Purificação parcial do sobrenadante bruto	21
4.10.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio	21
4.10.2 Cromatografia Líquida de Gel Filtração (Sephadex G – 100)	22
4.10.3 Membrana de Ultrafiltração do sobrenadante bruto parcialmente purificado	22
4.10.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante bruto parcialmente purificado.....	23
4.10.5 Quantificação de proteínas totais do sobrenadante bruto parcialmente purificado .	23
4.11 Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado	24
4.11.1 Estabilidade térmica do sobrenadante bruto parcialmente purificado	24
4.11.2 Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente a refrigeração e congelamento.....	24
4.11.3 Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente às enzimas proteolíticas.....	25
4.12 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado	25
4.12.1 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente a bactérias de importância ambiental.....	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Análises Físico-Químicas das amostras de sedimento	27
5.2 Contagem total de bactérias heterotróficas das amostras de sedimento	28
5.3 Caracterização preliminar e identificação por Maldi-Tof/MS dos isolados bacterianos	28
5.4 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados bacterianos.....	29
5.5 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelas bactérias selecionadas...	31
5.5.1 Teste da sobrecamada.....	31
5.5.2 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas pelo Método de Difusão em Ágar com Discos	32
5.6 Identificação do isolado sed 2.2 pelo gene 16S rRNA.....	32
5.7 Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2 e produção da substância antimicrobiana	33
5.8 Purificação parcial do sobrenadante bruto	34

5.8.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	34
5.8.2	Cromatografia Líquida de Gel Filtração (Sephadex G - 100)	34
5.8.3	Membrana de Ultrafiltração do sobrenadante bruto parcialmente purificado	35
5.8.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante bruto parcialmente purificado.....	36
5.8.5	Quantificação de proteínas totais do sobrenadante bruto parcialmente purificado .	36
5.9	Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado	37
5.9.1	Estabilidade térmica do sobrenadante bruto parcialmente purificado	37
5.9.2	Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente à refrigeração e congelamento.....	38
5.9.3	Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente às enzimas proteolíticas.....	38
5.10	Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado	38
5.10.1	Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente a bactérias de importância ambiental.....	39
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	46
8.	REFERÊNCIAS	47
9.	ANEXOS	60
9.1	Artigo.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado dos parâmetros físico-químicos analisados nas três amostras de sedimento coletadas na área úmida da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS.....	27
Tabela 2 – Resultado da quantificação de bactérias heterotróficas por ponto das amostras de sedimento analisadas provenientes da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina, São Leopoldo/RS	28
Tabela 3 – Resultado da identificação dos isolados bacterianos através do Maldi-Tof, usando o banco de dados Biotyper 4.0 <i>software</i> MBT OC.	29
Tabela 4 – Dados da purificação mostrando as frações obtidas nos diferentes passos da purificação da substância antimicrobiana produzida pelo isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2.....	37
Tabela 5 – Espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido pelo isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2, com a média dos halos de inibição em milímetros (mm)	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural geral dos peptídeos antimicrobianos derivados da família Bacillaceae. (A) lipopeptídeos; (B) DKPs; (C) tiopeptídeos; (D) Peptídeos cíclicos e lineares típicos.....	10
Figura 2 – Localização dos pontos amostrais da área úmida na Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS.	15
Figura 3 – Percentagem de isolados bacterianos com atividade enzimática, provenientes da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS.....	30
Figura 4 – Resultado dos testes enzimáticos.	31
Figura 5 – Teste da sobrecamada realizado com o isolado sed 2.2, utilizando a cepa <i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547, como indicadora.....	32
Figura 6 – Curva de crescimento do isolado bacteriano <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2 e produção de atividade antimicrobiana. A densidade óptica (♦) e a atividade antimicrobiana foram (■) monitoradas.....	33
Figura 7 – Resultados da precipitação fracionada com sulfato de amônio com a atividade antimicrobiana (UA/mL) dos sobrenadantes de cada precipitado e os diferentes intervalos de saturação do sulfato de amônio do isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2.....	34
Figura 8 – Perfil de eluição do precipitado (0 – 60%) em coluna de gel filtração Sephadex G – 100. A absorbância a 280 nm (♦) e a atividade antimicrobiana em UA/ mL (■) foram determinadas para cada fração coletada.....	35
Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da substância antimicrobiana do isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE e coradas com prata para verificação das bandas de proteína. M: marcador de proteína, A: extrato bruto, B: precipitado, C: cromatografia líquida de gel filtração Sephadex (G- 100).....	36
Figura 10 – Estabilidade térmica da substância antimicrobiana parcialmente purificada produzida pelo isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 2.2 após incubação por 100 °C em diferentes intervalos de tempo em relação ao controle.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Atividade residual
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
°C	Grau Celsius
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Grama
GRAS	<i>Generally Recongnized as Safe</i>
KDa	Quilodalton
MALDI – TOF	Espectrometria de massa associada à ionização/dessorção de matriz assistida por laser
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
nm	Nanometro
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPT	Precipitado
PNMIL	Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SDS PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate - Poliacrylamide gel electrophoresis</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UA	Unidades Arbitrárias
UC	Unidade de Conservação
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
V	Volts

Vol	Volume
YMA	<i>Yeast Mannitol Agar</i>
µL	Microlitros
>	Maior que

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, compreendendo mais de 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais. Ocorrendo diferentes biomas em seu território. No Rio Grande do Sul ocorrem o Bioma Pampa e a Mata Atlântica.

Dentre esses biomas encontramos as áreas úmidas, que são ambientes presentes em praticamente todos os tipos de ecossistemas e são importantes para a manutenção da diversidade biológica devido à sua alta produtividade, reciclagem de nutrientes e para a regulação do clima. Devido à abundância de matéria orgânica, esses ecossistemas abrigam um grande número de comunidades microbianas, além da flora e da fauna. Os micro-organismos presentes nas áreas úmidas desempenham papéis ecológicos importantes nos ciclos biogeoquímicos, na retenção e na liberação de nutrientes e muitos micro-organismos são conhecidos por produzir diversos compostos bioativos, incluindo enzimas de interesse industrial e peptídeos antimicrobianos.

Diversos gêneros bacterianos presentes em áreas úmidas estão sendo isolados e estudados e um exemplo é o gênero *Bacillus*. Bactérias pertencentes a este gênero são ubíquas na natureza e frequentemente são isoladas de amostras ambientais, incluindo o sedimento. Pesquisadores já relataram que este gênero é predominante nas amostras de sedimento de diversas áreas úmidas analisadas. Muitas espécies de *Bacillus* são descritas como produtoras de importantes metabólitos secundários. Com isso tornam-se relevantes as pesquisas com este gênero, pois esses micro-organismos são fontes de produção de substâncias naturais como antibióticos, inseticidas, promotores de crescimento, enzimas com potencial biotecnológico e substâncias com atividade antimicrobiana.

Explorar a biodiversidade desses ambientes é um caminho viável e sustentável para a obtenção de novas moléculas bioativas, visto que alguns micro-organismos são reconhecidos como produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi isolar, identificar e prospectar linhagens bacterianas provenientes de sedimentos do Parque Municipal Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS, quanto ao potencial de produção de novas moléculas com atividade antimicrobiana.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as amostras do sedimento em relação à sua composição físico-química;
- Quantificar as bactérias heterotróficas cultiváveis presentes nas amostras de sedimentos obtidas de áreas úmidas do referido Parque;
- Identificar os isolados bacterianos via estudos proteômicos, por espectrometria de massa, associada à ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF MS).
- Verificar a atividade biológica dos isolados bacterianos;
- Verificar a produção e caracterização de compostos com potencial antimicrobiano.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Áreas úmidas

No ano de 1971 foi realizada no Irã a Convenção sobre Zonas Úmidas de Importância Internacional, (“Convenção de Ramsar”), consistindo de um tratado intergovernamental criado com o intuito de proteger os habitats aquáticos importantes para a conservação de aves migratórias. Com o tempo, ampliou-se a sua preocupação com as demais áreas úmidas, de modo a promover sua conservação e uso sustentável (MMA, 2018). Tal Convenção considerou como Áreas Úmidas, as “áreas de pântano, charco, turfa ou água, natural ou artificial, permanente ou temporária, com água estagnada ou corrente, doce, salobra ou salgada, incluindo áreas de água marítima com menos de seis metros de profundidade na maré baixa”. Além de regular o regime hídrico de vastas regiões, essas áreas funcionam como fonte de biodiversidade em todos os níveis tróficos, cumprindo também o papel relevante de caráter econômico, cultural e recreativo, e ao mesmo tempo atendendo às necessidades de água e alimentação para inúmeras espécies (MMA, 2018).

Estes importantes ecossistemas apresentam altas concentrações energéticas e produzem uma grande quantidade de biomassa devido à abundância de nutrientes que acumulam (FZB, 2012), além de estarem distribuídos em praticamente todas as regiões do planeta (Jungblut et al., 2012). Devido à abundância de matéria orgânica, esses ecossistemas abrigam um grande número de comunidades microbianas, além da flora e da fauna (Falkowski et al., 2008; Thatoi et al., 2013; Wang et al., 2013). Globalmente, esses ambientes encontram-se sob uma alta pressão devido às atividades antropogênicas, tais como as mudanças climáticas, o uso inadequado da terra e as alterações na hidrologia, gerando perturbações e grandes desgastes para estes habitats (Bodelier & Dedysh, 2013). Segundo o Atlas Socioambiental de São Leopoldo (2012), os banhados gaúchos sofrem ameaças crescentes de destruição, além de muitos já terem sido extintos. Como já mencionado anteriormente, esses habitats abrigam grande variedade de espécies, incluindo espécies endêmicas, contudo, a compreensão sobre os micro-organismos que colonizam esses ambientes, bem como a sua diversidade metabólica ainda é escassa, justificando a necessidade de pesquisas mais intensas e abrangentes.

3.2 Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina (PNMIL)

A Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina (PNMIL) foi criada através do Decreto 4.330/2005 (SEMMAM, 2016) e sua importância está relacionada ao fato de apresentar uma conexão entre a flora de São Leopoldo e as matas mais ricas da Encosta da Serra, possibilitando a dispersão natural entre as espécies próprias do Parque com aquelas de áreas adjacentes (Atlas Socioambiental, 2012).

O Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina possui abrangência regional e constitui a maior unidade de conservação em área urbana do Estado do Rio Grande Sul. A maior parte da área do Parque está inserida dentro da bacia de inundação do Rio dos Sinos (aproximadamente 176 hectares), no bioma Mata Atlântica. De acordo com o SOS Mata Atlântica (2016), o município de São Leopoldo possui cerca de 690 hectares de Mata Atlântica, o que representa 6,76% da Mata Atlântica original do município.

Os objetivos do Parque Imperatriz são: i) preservar o patrimônio ambiental representado pelo banhado junto à Avenida Imperatriz Leopoldina, ii) preservar e recuperar a vegetação e fauna nativas características do banhado, iii) desenvolver atividades de Educação Ambiental e Ecoturismo, integrando socialmente a área na comunidade da região e iv) desenvolver atividades esportivas e culturais em áreas pré-determinadas, criando uma alternativa controlada de lazer para a comunidade da região (Atlas Socioambiental, 2012).

3.3 Comunidades microbianas em ambientes de áreas úmidas

O Brasil ocupa quase metade da América do Sul, sendo reconhecido mundialmente como uma importante zona de *hotspot* (regiões de grande riqueza biológica, que estão extremamente ameaçadas de extinção), com a maior diversidade de espécies animais e vegetais no mundo (MMA, 2018). O que torna o Brasil tão diverso é a ocorrência em seu território de diferentes biomas, refletindo em uma enorme riqueza de flora e fauna. Dentre as comunidades presentes no solo, podem ser encontrados organismos procarióticos e eucarióticos, como bactérias, fungos, insetos, nematóides, protozoários e os oligoquetos (Brady & Weil, 2013), e nas áreas úmidas os micro-

organismos podem ser citados como responsáveis por desempenhar papéis ecológicos importantes e que são fundamentais para as funções destes ecossistemas (Hu et al., 2014).

Ao analisar o efeito das atividades microbianas sobre o crescimento e desempenho das plantas, Lamers et al. (2012) mostraram que os ciclos biogeoquímicos que são catalisados por micro-organismos podem controlar a composição da vegetação em áreas úmidas.

A partir de uma meta análise realizada por Xiaofei et al. (2014) foi examinada a diversidade bacteriana de uma gama de solos e sedimentos de áreas úmidas. Foram analisadas um total de 14.424 sequências de micro-organismos procariotos, oriundas do *GenBank*. O gênero *Flavobacterium* foi a bactéria dominante em áreas úmidas, seguido por *Nitrosospira* sp. e *Nitrosomonas* sp. Enquanto que para Archaea, os gêneros dominantes foram *Fervidicoccus* sp. e *Methanosaeta* sp.

Ansola et al. (2014) utilizaram a técnica de pirosequenciamento do gene 16S rRNA, com o intuito de caracterizar a comunidade bacteriana do solo de áreas úmidas. Foram analisados dois ambientes: uma área úmida que recebia águas residuais do município e uma área úmida preservada. No geral, as comunidades bacterianas da área úmida preservada eram mais diversificadas do que as da área úmida que recebiam as água residuais. Os principais grupos filogenéticos encontrados nos dois locais foram: Proteobacteria, Verrucomicrobia e Chloroflexi, sendo que Proteobacteria foi o grupo dominante na composição da comunidade.

Devido às ferramentas que vêm sendo utilizadas e as vantagens que essas oferecem, o sequenciamento de nova geração se tornou uma escolha entre os pesquisadores nos estudos sobre a diversidade bacteriana. O pirosequenciamento do gene 16S rRNA foi utilizado para estudos da diversidade microbiana em diferentes áreas úmidas na Rússia (Serkebaeva et al., 2013) e também em áreas úmidas de água doce na Virgínia (Peralta et al., 2013). Deng et al. (2014) estudaram a composição e diversidade da comunidade bacteriana presente em solos de áreas úmidas, e os resultados mostraram abundância nos grupos Proteobacteria (37,5%), seguido de Actinobacteria (17,3%) e Bacteroidetes (11%).

Outro fator importante no estudo de áreas úmidas é a variação espacial da comunidade bacteriana. Zhang et al. (2017) analisaram a estrutura da comunidade bacteriana e os fatores biogeoquímicos que podiam influenciar esta comunidade

juntamente com a sucessão dos habitats. Foram analisadas 39 amostras de sedimento de locais diferentes através do sequenciamento do gene 16S rRNA. A área úmida costeira apresentou uma comunidade associada a diferentes funções, e os gêneros encontrados foram *Planctomyces*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Salinivibrio* e *Salinibacter*. Enquanto o outro ambiente era dominado por bactérias como *Hydrogenophaga*, *Nitrospira*, *Pseudomonas* e *Thiobacillus*. Por fim, o terceiro ambiente apresentou maior abundância relativa de *Lutimonas*, *Desulfococcus*, *Photobacterium*, *Propionigenium* e *Vibrio*. Segundo os autores, a variação espacial na comunidade bacteriana foi correlacionada a fatores como pH, salinidade e concentração de sulfato. Também foi evidenciado que existem fortes ligações entre a variação na estrutura da comunidade bacteriana e o tipo de ecossistema.

No trabalho de Liu et al. (2017) foi estudada a diversidade bacteriana de *Bacillus* em sedimentos de uma área úmida na China, através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram identificadas quatro famílias bacterianas, Bacillaceae (58%), Paenibacillaceae (22%), Alicyclobacillaceae (15%) e Planococcaceae (5%) e nove gêneros, *Bacillus* (42%), *Paenibacillus* (16%), *Halobacillus* (13%), *Alicyclobacillus* (11%), *Rummeliibacillus* (5%), *Cohnella* (5%), *Tumebacillus* (4%), *Pontibacillus* (3%) e *Aneurinibacillus* (2%). Lee et al. (2014) isolaram bactérias do solo de uma área úmida, e para identificação dos isolados bacterianos foi utilizada a análise do gene 16S rRNA. Com base nas evidências do estudo, as duas cepas estudadas (GH2- 4T e GH2-5) representavam uma nova espécie do gênero *Bacillus*, para os quais os nomes *Bacillus solimangrovi* sp. nov GH2-4T (KC 616733) e *Bacillus solimangrovi* sp. nov GH2-5 (KC 616734) foram propostos.

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* são bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, anaeróbios ou aeróbios facultativos, formadores de endósporos em condições adversas e onipresentes na natureza, habitando muitos nichos ecológicos (Gopal et al., 2015). Essas bactérias são amplamente utilizadas como fontes de enzimas em diversos setores industriais, como alimentícios, têxteis, químicos e detergentes (Jain et al., 2012; Ozcan & Kurdal, 2012; Adrio & Demain, 2014; Zarai et al., 2015; Contesine et al., 2017). Uma atenção especial é dada a este gênero devido às suas taxas de crescimento rápido e produção de ciclos curtos de fermentação, além da sua expressiva capacidade de secretar quantidade significativas de proteínas para o meio extracelular (Sewalt et al., 2016). O interesse pelas espécies de *Bacillus* aumentou

concomitantemente na área de biotecnologia, com técnicas de biologia molecular empregadas para produzir produtos homólogos e proteínas heterólogas. No final da década de 1950, Spizizen descreveu o primeiro protocolo usando *Bacillus subtilis* como hospedeiro para proteínas recombinantes (Rahmer et al., 2015).

Na agricultura, os *Bacillus* spp. associados com raízes de plantas desenvolvem biofilmes e com isso aumentam o crescimento vegetal (Beauregard et al., 2013). Os fertilizantes à base de *Bacillus* podem aumentar os nutrientes disponíveis nas plantas e controlar o crescimento de micro-organismos fitopatogênicos (Garcia-Fraile et al., 2015; Kang et al., 2015b).

Para a indústria farmacêutica, o *Bacillus* apresenta várias vantagens, o que torna este gênero muito relevante neste setor. A maioria das cepas de *Bacillus* é não-patogênica e livre de exo e endotoxinas, uma característica muito vantajosa para aplicação (Lakowitz et al., 2018). Espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* têm o estado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), considerado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como seguro (GRAS, 2016).

3.4 Substâncias bioativas produzidas por micro-organismos ambientais

3.4.1 Enzimas extracelulares produzidas por bactérias

Dentre vários organismos, as bactérias tornaram-se a escolha para inúmeros processos industriais. Uma das principais razões para isso é o fato de que podem ser geneticamente modificadas para assim produzir a atividade desejada, minimizando os produtos indesejáveis (Ghani et al., 2013). As proteases microbianas apresentam um diversificado leque de aplicações nas indústrias, seja alimentícia, farmacêutica, petrolífera, como também na pesquisa científica, constituindo um dos grupos comercialmente mais importantes de enzimas, representando em torno de 65% do mercado total (Omrane et al., 2016). Essas enzimas são frequentemente utilizadas em diversos segmentos, como: detergentes, síntese de peptídeos, têxtil, laticínios, biorremediação, entre outros (Jaouadi et al., 2013; Omrane et al., 2016; Dutta et al., 2016). Sendo assim, é de grande importância no desenvolvimento de bioprocessos industriais (Adrio & Demain, 2014).

Dentre os micro-organismos, as bactérias são um dos grupos mais importantes

no que diz respeito à produção de proteases, e o gênero *Bacillus* é possivelmente a fonte mais proeminente dessas moléculas. Várias espécies de *Bacillus* produzem proteases neutras e alcalinas (Rehman et al., 2016, Anandharaj et al., 2016), o que é de grande interesse para as indústrias (Contesini et al., 2017).

Na pesquisa realizada por Menasria et al. (2018) foi discutida a diversidade e o potencial de bactérias isoladas de áreas úmidas de um manguezal, a produção de enzimas e suas aplicações em processos biotecnológicos. Os mesmos avaliaram a produção de amilase, celulase, gelatinase, lipase, pectinase, protease e xilanase, tendo obtido resultados significativamente positivos, uma vez que cerca e 75% dos seus isolados bacterianos produziram pelo menos duas enzimas hidrolíticas. Li et al. (2017) investigaram a diversidade de bactérias produtoras de proteases em diferentes sedimentos, e todas as bactérias isoladas pelos pesquisadores, foram produtoras de proteases. Outros pesquisadores também investigaram a produção de enzimas extracelulares em ambientes de áreas úmidas. Arumugam et al. (2017) avaliando sedimento de um manguezal, a fim de se buscar bactérias produtoras de enzimas, observaram na grande maioria dos seus isolados bacterianos a produção de amilase, celulase, lipase e protease, enquanto que Bibi et al. (2017), em 41% dos seus isolados, verificaram a ocorrência de atividade lipolítica, em 30% atividade celulolítica, 19% amilolítica e 8% proteolítica. Na pesquisa de Ghani et al. (2013), várias linhagens de *Bacillus licheniformis* foram testadas quanto à produção de enzimas comercialmente importantes, como a alfa-amilase, protease, pectinase e celulase, e todos os isolados mostraram-se produtores destas enzimas.

3.4.2 Produção de substâncias com atividade antimicrobiana

A partir da descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, vários estudos com antibióticos começaram a se desenvolver, e com isso muitas estratégias terapêuticas tornaram-se possíveis. Contudo, o amplo uso dessas drogas fez com que surgissem os patógenos resistentes a múltiplas drogas, tornando assim o uso desses fármacos limitado (Mahlapuu et. al., 2016). Com o objetivo de solucionar este problema, novas e não convencionais terapias anti-infecciosas foram postas em desenvolvimento (Sosunov et al., 2007; Steiner et al., 2008; Piper et al., 2012; Czaplewski et al., 2016). Diante deste contexto algumas moléculas bioativas estão sendo utilizadas como novas

estratégias para o tratamento de infecções bacterianas (Renwick et al., 2016). Esses peptídeos são diversos grupos de biomoléculas naturais que ocorrem tanto nos eucariotos, como plantas, animais vertebrados e invertebrados, e nos procariotos, micro-organismos em geral (Bagley 2014; Berglund et al., 2015). Esses novos compostos podem ser utilizados em abordagens combinatórias para combater patógenos infecciosos resistentes aos antibióticos (Hassan et al. 2012).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em duas principais classes: peptídeos não sintetizados ribossomicamente e os peptídeos sintetizados ribossomicamente (bacteriocinas) (Ye et al., 2013). As bacteriocinas são proteínas complexas com atividade bactericida contra espécies intimamente relacionadas com os micro-organismos produtores, variam em peso molecular, nas propriedades bioquímicas, no espectro e no mecanismo de ação (Salazar et al., 2017). Várias abordagens foram tomadas para classificar as bacteriocinas em diferentes categorias que incluem sua natureza, mecanismos de resistência e de ação (Cotter et al., 2013). Elas são classificadas em dois principais grupos, de acordo com a sua estrutura. As Bacteriocinas da Classe I e Bacteriocinas da Classe II.

As bacteriocinas da Classe I são pequenos peptídeos com tamanhos moleculares < 5 KDa. Geralmente contêm aminoácidos como a lantionina ou β -metil lantionina em suas sequências, e, portanto, são chamadas de bacteriocinas pós-traducionalmente modificadas. As bacteriocinas da Classe II também são pequenos peptídeos, estáveis ao calor, contêm de 25 a 70 resíduos de aminoácidos e são divididos em subgrupos (Bédard & Biron 2018).

- Classe IIa: as bacteriocinas pertencentes a esse grupo também são chamadas de bacteriocinas do tipo pediocina, conhecidas também por sua forte atividade antilisteria. Contêm de 35 a 50 resíduos de aminoácidos.

- Classe IIb: são conhecidas também como bacteriocinas de dois peptídeos, e agem pela ação complementar de dois peptídeos diferentes.

- Classe IIc: são bacteriocinas cíclicas, contendo de 35 a 70 aminoácidos. O seu tamanho grande juntamente com o alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos, que são encontrados em vários membros desta classe, representa um grande desafio para a pesquisa.

- Classe IId: inclui bacteriocinas lineares. Como observado na classe IIb, existem poucos estudos elucidando a sua síntese (Bédard & Biron 2018).

Muitos micro-organismos são conhecidos por produzirem bacteriocinas, entre eles estão as espécies de *Bacillus* (Abdel-Mohsein et al., 2011; Zhao et al., 2017; Sumi et al., 2015). Estas bactérias produzem peptídeos curtos, compreendendo cerca de 30 resíduos ou menos que agem através de mecanismos diferenciados, tornando-os recalcitrantes aos modos tradicionais de resistência a fármacos (Zhao et al., 2018). Os peptídeos com estruturas variadas são considerados o maior grupo químico de antibióticos naturais e os derivados da família Bacillaceae são divididos em cinco categorias: lipopeptídeos, 2,5-dicetopiperazinas (DKPs), tiopeptídeos, peptídeos cíclicos típicos e peptídeos lineares (Figura 1) (Romano et al., 2011).

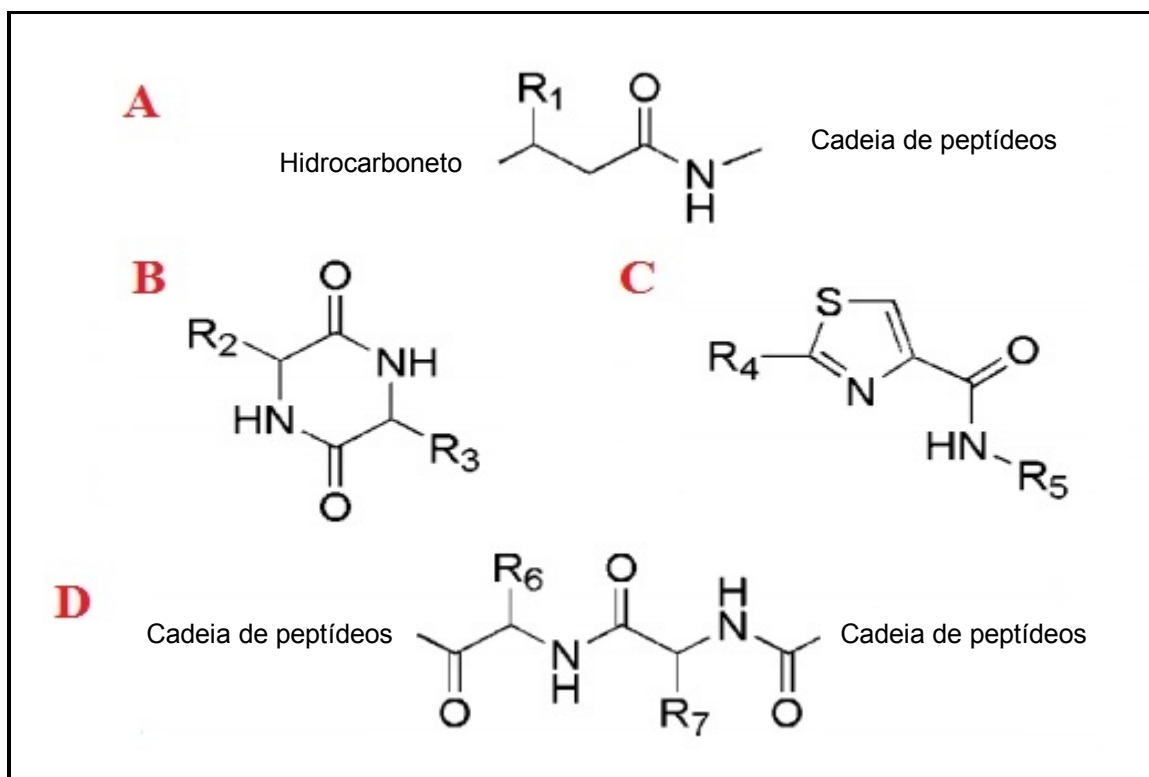


Figura 1 - Fórmula estrutural geral dos peptídeos antimicrobianos derivados da família Bacillaceae. (A) lipopeptídeos; (B) DKPs; (C) tiopeptídeos; (D) Peptídeos cíclicos e lineares típicos.

R₁ = H, OH ou NH₂; R₂, R₃, R₆ e R₇ = grupos funcionais (exceto amina e carboxila) entre os resíduos peptídicos; R₄ e R₅ = cadeias peptídicas altamente modificadas. Fonte: (Romano et al., 2011).

Os lipopeptídeos são compostos pequenos sintetizados por vários microorganismos como metabólitos secundários. Sua estrutura contém cadeias de ácidos graxos hidrofóbicos e peptídeos cíclicos hidrofílicos. Os lipopeptídeos dos *Bacillus* sp. são os mais estudados atualmente e são divididos em três grupos: surfactina, fengicina e iturina. Devido à estrutura anfipática, os lipopeptídeos apresentam atividade biológica bastante importante, incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antitumorais (Jiang et al. 2014).

Os 2,5-dicetopiperazinas (DKPs) são os menores peptídeos cíclicos e são formados pela condensação de dois aminoácidos (Kumar et al., 2014). Eles constituem uma grande classe de peptídeos microbianos e muitos possuem notável valor biológico com atividades farmacológicas. Os tiopeptídeos também conhecidos como peptídeos tiazolílicos são peptídeos ricos em enxofre sintetizados por ribossomos e modificados pós-traducionalmente. Possuem propriedades biológicas intrigantes e têm potente atividade antibacteriana. Em concentrações muito baixas, os tiopeptídeos têm demonstrado inibir a síntese protéica de um grande número de patógenos relevantes como *Clostridium*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Enterococcus* resistente à vancomicina, *Staphylococcus* resistente à metilina e *Streptococcus* resistentes à penicilina (Bennallack et al., 2014; Zhang & Liu, 2013).

Os peptídeos cíclicos foram utilizados com grande sucesso na terapêutica. Alguns fármacos que hoje são amplamente aplicados em tratamentos de infecções bacterianas são peptídeos cíclicos, como os antimicrobianos vancomicina, daptomicina e polimixina B (Craik et al., 2013). Esses peptídeos são facilmente produzidos por síntese química automatizada e são simples de modificar, manipular e caracterizar. Geralmente apresentam pouca ou nenhuma toxicidade devido à composição benigna dos aminoácidos (Zorzi et al., 2017).

3.5 Aplicação das bacteriocinas produzidas por isolados bacterianos ambientais

Devido ao seu potencial como inibidor de vários patógenos, à ação específica e à sua natureza não tóxica, observou-se um notável aumento em pesquisas com interesse na aplicação das bacteriocinas (Cotter et al., 2013). Esses compostos têm sido utilizados em diversas áreas, principalmente na biopreservação de diferentes alimentos (De Vuyst & Leroy, 2007; Perez et al., 2014), como carne, produtos lácteos, peixes, saladas, vegetais

e bebidas alcoólicas (Settanni & Corseti, 2008; Arqués et al., 2011; Yang et al., 2012; Todorov et al., 2014; Ramu et al., 2015; Ribeiro et al., 2016). Apesar do elevado potencial de aplicações no setor industrial, muitas bacteriocinas já foram isoladas e caracterizadas, contudo apenas a nisina tem aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização como conservante de alimentos (Mokoena, 2017).

Um problema bastante preocupante para a indústria de alimentos é a presença da bactéria *Listeria monocytogenes*, um patógeno de origem alimentar, presente em produtos alimentícios prontos para o consumo. É bastante desafiador controlar a *L. monocytogenes*, pois esta bactéria apresenta alta tolerância ao sal e a capacidade de proliferar em alimentos refrigerados e embalados a vácuo (Gandhi & Chikindas 2007). Alguns estudos já demonstraram atividade antilisterial utilizando as bacteriocinas (Nakamura et al., 2013; Kaur et al., 2014; Ünlü et al., 2015). A aplicação dessas bacteriocinas purificadas visa obter um produto final mais seguro (Sarika et al., 2012).

As bacteriocinas estão sendo utilizadas em outros setores também, como na agricultura, onde as formulações para biocontrole são alternativas aos pesticidas químicos, permitindo uma agricultura mais sustentável (Chowdhury et al., 2015). As doenças causadas por patógenos transmitidos pelo solo resultam em uma redução significativa no rendimento e qualidade de muitas culturas economicamente importantes (De Coninck et al., 2015). Bac IH7 é uma bacteriocina isolada de *Bacillus subtilis* IH7, esta bacteriocina foi relatada como um promotor de crescimento vegetal e também serviu como biocontrolador para *Alternaria solani* e outros patógenos de sementes (Hammami et al., 2011). As espécies de *Paenibacillus* também estão sendo estudadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. O isolado *Paenibacillus polymyxa* E681 apresentou uma potente atividade antimicrobiana quando testado contra fungos patogênicos de plantas como, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* e *Fusarium oxysporum*, bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*, e bactérias Gram-positivas como, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* (Park et al., 2017). Foi relatado que *Paenibacillus polymyxa* OSY- DF produz paenibacilina, um composto com atividade antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e outras bactérias Gram-positivas (He et al. 2007, 2008; Huang & Yousef., 2015). A paenicidina A produzida por *P. polymyxa* NRRL B-30509 exibiu atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Listeria monocytogenes* (Lohans et al., 2012).

Diante dos estudos apresentados, muitas bactérias de origem ambiental são produtoras de compostos bioativos, incluindo peptídeos que exibem atividade antimicrobiana contra importantes patógenos, com isso devem-se intensificar as pesquisas de prospecção desses micro-organismos, visto o potencial biotecnológico que eles possuem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

4.1.1 Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina

O Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina (figura 2) está localizado no município de São Leopoldo/RS (S 29°45' 37" e W 51°08' 50") e parte da área está inserida dentro da bacia de inundação do rio dos Sinos (aproximadamente 176 hectares).

4.1.2 Coleta das amostras de sedimento

As coletas de sedimento foram realizadas em uma área úmida da Unidade de Conservação (UC) Imperatriz Leopoldina (figura 2) localizada no município de São Leopoldo/RS, nos meses de janeiro, abril e maio de 2017. A área foi dividida em quatro quadrantes de onde foram coletadas quatro amostras de sedimento (coordenadas geográficas: Ponto 1 S 29°45'374"/ W 51°07'992, Ponto 2 S 29°45'365"/ W 51°07'982", Ponto 3 S 29°45'22.604"/ W 51°07'59.069", Ponto 4 S 29°45'22.344"/ W 51°07'58.920"). O ponto amostral 1 estava localizado próximo à margem do banhado e com algumas espécies arbustivas em sua volta. O segundo ponto amostral era caracterizado pela presença de plantas aquáticas e água corrente. Já o terceiro ponto amostral tinha como características a presença de plantas aquáticas densamente distribuídas, água parada e muitas espécies arbustivas ao redor. O quarto ponto apresentava poucas plantas aquáticas, troncos de árvores e foi considerado de difícil acesso.

Foram coletadas 500g de sedimento para análise físico-química e 100 g para contagem de bactérias heterotróficas, à profundidade de 40 cm da superfície, com o auxílio de um equipamento tipo draga. As amostras de sedimento foram transferidas para sacos estéreis, acondicionadas em uma caixa de isopor e conduzidas sob refrigeração, até o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foram imediatamente processadas.

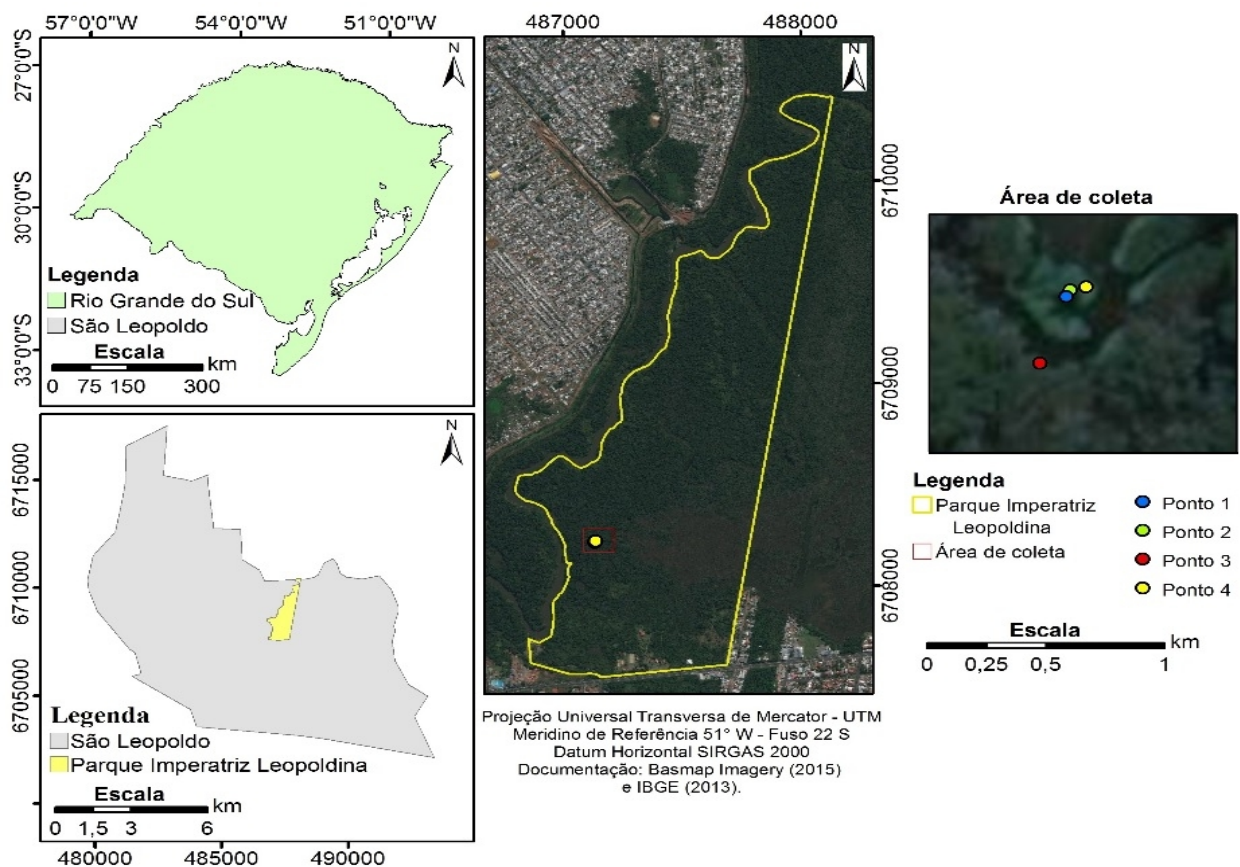


Figura 2 – Localização dos pontos amostrais da área úmida na Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS.

4.2 Análises físico-químicas das amostras de sedimento

Três amostras de sedimento foram submetidas às análises físico-químicas (Ponto 1, 2 e 3). Foram escolhidos esses pontos por apresentarem características distintas no ambiente amostrado. Para determinação de carbono orgânico, a técnica utilizada foi a de Combustão Úmida; a determinação de granulometria foi avaliada através da Dispersão; o Método de Kjeldahl permitiu a detecção de nitrogênio; o pH foi aferido através da Potenciometria e a umidade foi determinada através da Gravimetria, segundo Tedesco et al. (1995). As análises foram realizadas pelo Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS/RS.

4.3 Contagem total das bactérias heterotróficas das amostras de sedimento

Foram pesadas 25 g de cada amostra de sedimento em papel alumínio estéril, as quais foram transferidas para um frasco de Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 225 mL

de solução salina 0,85% correspondendo à diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição foram feitas as diluições decimais em triplicata até a diluição 10^{-8} . A seguir as amostras foram inoculadas em Ágar Padrão para Contagem (Himedia®) também em triplicata, utilizando a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Para a contagem das bactérias heterotróficas foram utilizadas as placas que apresentaram um número de colônias entre 25 e 250 e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia/grama (UFC/g) de sedimento. As colônias bacterianas que apresentaram morfologias diferentes foram selecionadas, e semeadas em caldo triptose de soja (Himedia®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após a turvação dos meios, esses foram semeados em placas contendo ágar triptose de soja (Himedia®) e incubados novamente a 37°C por 24 horas, para avaliação da pureza dos isolados e caracterização.

4.4 Caracterização preliminar e identificação por *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (Maldi-Tof/MS) dos isolados bacterianos

Primeiramente os micro-organismos foram avaliados quanto as suas propriedades morfotintoriais através da Coloração de Gram e pela prova da catalase. A partir do crescimento em ágar triptose de soja, uma colônia de cada isolado foi inoculada em microtubos de 1,5 mL, com 300 µL de água Milli-Q e 900 µL de etanol absoluto. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 13.000 rpm, durante 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco a temperatura ambiente. Na sequência foi adicionado ácido fórmico 70% (30 µL) ao sedimento e acetonitrila puro (30 µL) seguidos de homogeneização em vórtex e nova etapa de centrifugação durante 2 minutos à velocidade de 13.000 rpm, de tal forma que todo o material fosse recolhido em um *pellet*. Logo após, foi pipetado 1 µL de sobrenadante sobre uma placa de aço inoxidável e deixado secar a temperatura ambiente. Subsequentemente foi adicionado 1 µL de matriz constituída de solução de ácido α ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA) (Sauget et al., 2016). As análises foram realizadas em um aparelho MALDI Biotyper 4.0, *software* MBT OC, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.5 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados bacterianos

4.5.1 Prova da amilase

Para a prova da amilase os isolados bacterianos foram semeados em triplicata em placas contendo Ágar Nutriente (Himedia®), suplementado com uma solução de amido solúvel 0,2% (Fleischmann®). As culturas foram incubadas na temperatura de 37°C por 48 horas, após intervalo de crescimento adicionou-se uma solução de lugol para revelar a atividade enzimática. Para o controle positivo inoculou-se a cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 (Hankin; Anagnost Akis, 1975).

4.5.2 Prova da atividade proteolítica

Para avaliar a atividade proteolítica os isolados bacterianos foram semeados em placas contendo Ágar leite desnatado 10% (Peptona bacteriológica 5g/1000mL , extrato de levedura 3g/1000mL, ágar bacteriológico 12g/1000mL e leite UHT desnatado 10%) e incubados nas mesmas condições citadas acima. Após período de incubação foi verificada a presença de halos ao redor do crescimento bacteriano. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi inoculada como controle positivo (Frazier & Rupp, 1928; Montanhini & Bersot, 2013).

4.5.3 Produção de gelatinase

Para verificação da produção de gelatinase os isolados bacterianos foram semeados em tubos contendo caldo nutritivo (Extrato de carne 3g/1000mL, peptona bacteriológica 5g/1000mL e 12% de gelatina- Fleishmann®) e incubados nas condições descritas acima. Após o período de incubação os tubos foram para um banho de gelo por 30 minutos, tubos com o meio sólido significa que o micro-organismo não produz a enzima, portanto o meio ficará sólido, tubos com o meio líquido significa que o micro-organismo produz a enzima. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo (Marra et al., 2007).

4.5.4 Prova da lipase

A fim de se avaliar a atividade lipolítica, os isolados foram semeados em placas contendo Ágar Tributirina e incubados a 37°C por 72 horas. Após período de incubação foi verificada a presença de halos ao redor do crescimento bacteriano. Para o controle positivo inoculou-se a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Montanhini & Bersot, 2013).

4.6 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelas bactérias selecionadas

Para o teste da sobrecamada algumas bactérias foram selecionadas, baseado nos desempenhos evidenciados nos testes enzimáticos. Para o Teste de Difusão em Ágar com discos foi selecionado o isolado bacteriano que apresentou melhor resultado no teste da sobrecamada. Adotou-se este critério, pois o objetivo era selecionar um isolado bacteriano que apresentasse um bom desempenho em ambos os testes.

4.6.1 Teste da sobrecamada

A atividade antimicrobiana dos isolados do sedimento foi determinada primeiramente, através do teste da sobrecamada. Os isolados foram inoculados em picada em triplicata sobre placas contendo Ágar Mueller-Hinton (Kasvi®) e incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi vertida uma sobrecamada de ágar triptose de soja (Himedia®) semi-sólido 0,6%, inoculado com 1% das cepas indicadoras *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, contendo aproximadamente $1,9 \times 10^8$ UFC/mL. As placas inoculadas foram incubadas novamente a 37°C por 24 horas. O teste foi realizado de acordo com Kékessy & Piguet (1970), com algumas modificações. Após o período de incubação foi verificada a presença ou não de halos de inibição, os quais foram medidos e expressos em milímetros (mm). De acordo com Oliveira et al. (1998) *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 foi empregado como controle, por ser considerada uma bactéria sensível a todas outras bacteriocinas já testadas.

4.6.2 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas pelo Método de Difusão em Ágar com Discos

Para obtenção do pré-inóculo do isolado bacteriano, utilizou-se o meio de cultivo caldo triptose de soja (Himedia®) a 30°C por 24 horas. Após transferiu-se 1% do pré-inóculo para um frasco de Erlenmeyer de 100 mL, contendo 50 mL do mesmo meio de cultivo e a cultura foi então incubada a 30°C por 48 horas em um agitador orbital com velocidade de 50 rpm. As células foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos, em seguida o sobrenadante livre de células foi retirado e colocado em outro microtubo, onde foi aquecido em banho seco a 95°C por 12 minutos para inativação das células bacterianas, e o pH aferido. Para a determinação da atividade antimicrobiana foi realizado o Teste de Difusão em Ágar com Discos de acordo com Motta & Brandelli, (2002). Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante livre de células foi aplicado em discos de papel filtro (6 mm) em placas de Mueller-Hinton (Kasvi®) previamente inoculadas com a suspensão de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 de acordo com a escala de turbidez de MacFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de diluição seriada, e a atividade foi expressa como a recíproca da última diluição onde ocorreu uma zona de inibição e expressa como unidades arbitrárias (UA) por mililitro (mL) (Mayr-Harting et al., 1972).

4.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA

4.7.1 Extração do DNA total

Para extração do DNA total, o isolado foi previamente cultivado em meio ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Oxoid®) e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação colônias isoladas foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de caldo BHI, e incubadas novamente a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, foi transferido 1 mL deste crescimento para microtubo de 1,5 mL e centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado ao precipitado (*pellet*) 40 µL de solução de lise, seguido de homogeneização e aquecimento da amostra durante 15 minutos a 100°C. Na sequência foi adicionado 460 µL de tampão TE, que contém 10 mM Tris para

estabilizar o pH e EDTA que sequestra o cálcio e o magnésio para preservar o material (DNA), seguido de homogeneização e centrifugação à 13.000 rpm durante 5 minutos (Donato, 2007).

4.7.2 Amplificação do gene 16S rRNA

A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1µL de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água MilliQ estéril para completar o volume da reação. Foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador com sequências F C27 3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5' e R 530 3'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-5' (Gontang et al. 2007). A PCR foi realizada nas condições de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 53°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com extensão final de 4 minutos a 72°C. O DNA utilizado como controle positivo foi proveniente da bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. As reações foram realizadas em termociclador modelo 2720 Thermocycler (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose em concentração 1,5%, com a utilização do marcador de peso molecular 1 kb (Qiagen). A visualização foi realizada em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging).

4.7.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os fragmentos obtidos foram sequenciados em uma orientação no laboratório ACT Gene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) no sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados pelo programa Chromas versão 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd) e comparados ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.8 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas em diferentes meios de cultivo

Baseado em critérios estabelecidos, tais como o melhor desempenho na produção de enzimas hidrolíticas, bem como a produção de atividade antimicrobiana, apenas um isolado foi selecionado para os demais ensaios. Para a avaliação do desempenho da bactéria selecionada, foram usados seis diferentes meios de cultivo, visando à maior produção da substância antimicrobiana. Os meios de cultura empregados foram: caldo TSB (caldo triptose de soja) - Himedia®; caldo TSB + água do banhado (1000 mL água do banhado); caldo sedimento 1 (30g de sedimento/1000 mL água destilada); caldo sedimento 2 (60g de sedimento/1000 mL de água destilada), caldo BHI (infusão de cérebro e coração) - Oxoid® e caldo BHI + água do banhado (1000 mL água do banhado), os demais procedimentos foram realizados conforme descrito no item 4.6.2.

4.9 Curva de crescimento do isolado bacteriano *Bacillus* sp sed 2.2 e produção da substância antimicrobiana

Diante da escolha do melhor meio de cultivo, foi realizada uma curva de crescimento e produção da substância antimicrobiana, a fim de se determinar o melhor tempo de cultivo. Uma alíquota de 1,0 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de caldo triptose de soja (TSB) Himedia®. Este foi considerado o ponto zero da curva. Em intervalos de 3 horas, num total de 57 horas, foi realizada a medida de absorbância a 600 nm, aferição do pH, determinação das unidades formadoras de colônia, segundo Milles & Mirsa (1938), e das unidades arbitrárias, pela técnica de Difusão em Ágar com discos, descrito no item 4.6.2. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C, por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

4.10 Purificação parcial do sobrenadante bruto

4.10.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

Logo após a determinação do melhor tempo de cultivo para a produção de

substância antimicrobiana, foi realizada a precipitação do sobrenadante livre de células para a definição da concentração necessária de sulfato de amônio. A precipitação fracionada foi realizada nos seguintes intervalos: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% de saturação. Sendo assim, foram colocados 150 mL do sobrenadante livre de células em banho de gelo, com agitação magnética contínua, e vagarosamente foi adicionado o sulfato de amônio, a fim de se atingir a primeira concentração de 20% (Scopes, 1994). Após, foi deixado em agitação por 30 minutos e posteriormente foi centrifugado a 10.000 rpm, 4°C, por 15 minutos. O *pellet* foi separado do sobrenadante e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6. O sobrenadante retornou ao banho de gelo para proceder-se com as precipitações nas demais faixas de saturação. Em todos os intervalos de saturação foi avaliada a atividade antimicrobiana dos precipitados e dos sobrenadantes do precipitado conforme Motta & Brandelli (2002), com modificações (sem os discos de papel filtro), a fim de determinar a melhor concentração de sulfato de amônio. As placas foram incubadas em estufa a 30°C, por 24 horas, e a bactéria indicadora utilizada foi *Corynebacterium fimi* NCTC 7547.

4.10.2 Cromatografia Líquida de Gel Filtração (Sephadex G – 100)

Dando prosseguimento à purificação parcial do sobrenadante livre de células, foi realizada a cromatografia líquida de gel filtração, onde uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante livre de células precipitado com sulfato de amônio, foi eluído em coluna de gel filtração, com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6. Foram coletadas 30 frações de 1,0 mL e sua absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm. Em seguida, todas as frações foram liofilizadas individualmente, para concentração da substância antimicrobiana. Para ressuspenso cada uma das amostras de 1 mL, foi utilizado 100 µL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6, e na sequência foi determinada a atividade antimicrobiana de todas as frações coletadas, utilizando a cepa *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, incubadas a 30 °C por 24 horas.

4.10.3 Membrana de Ultrafiltração do sobrenadante bruto parcialmente purificado

Foi utilizado o sistema de ultrafiltração do tipo Amicon® com membrana de

retenção de 30 KDa, onde 500 µL do sobrenadante livre de células obtido através da Cromatografia Líquida de Gel filtração (Sephadex G -100) foram adicionados ao filtro e centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos à 4°C. Após a centrifugação o conteúdo foi repassado para outro microtubo de 1,5 mL, e o conteúdo restante do filtro foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos à 4°C. Após este procedimento, a atividade antimicrobiana foi testada, usando as duas frações (filtrado e retido), contra a cepa indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. A placa foi incubada a 30 °C por 24 horas.

4.10.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante bruto parcialmente purificado

A fim de se estimar o peso molecular da substância e o seu grau de pureza, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, conforme Bhunia & Johnson (1992), com modificações. Alíquotas do sobrenadante bruto, do precipitado e da cromatografia líquida de gel filtração Sephadex G-100 foram adicionadas de tampão de eletroforese e em seguida foram fervidas durante 5 minutos a 100°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi realizada com uma corrente de 50 ma com voltagem de 200 V. Após, o gel foi lavado com água destilada para remoção do SDS e corado com prata a fim de se observar as bandas de proteína. O peso molecular da substância foi estimado através do marcador Mark 12TM Invitrogen.

4.10.5 Quantificação de proteínas totais do sobrenadante bruto parcialmente purificado

Para determinar a concentração de proteína solúvel em cada uma das frações obtidas durante as etapas de purificação (extrato bruto, precipitado e cromatografia líquida de gel filtração Sephadex G-100), foi utilizado o método de Lowry et al. (1951). Foi realizada uma curva padrão com soro albumina bovina e a absorbância foi medida a 750 nm calculando-se as concentrações de proteína solúvel. O experimento foi realizado em duplicata.

4.11 Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado

4.11.1 Estabilidade térmica do sobrenadante bruto parcialmente purificado

A estabilidade térmica do sobrenadante livre de células parcialmente purificado através da G-100 foi determinada através da exposição do composto a temperatura de 100 °C por diferentes tempos: 3, 5, 10 e 15 minutos e 121°C/105 kPa por 15 minutos (autoclave), segundo Motta et al. (2007) com modificações. Foram realizados controles com alíquotas sem tratamento térmico a fim de calcular a atividade antimicrobiana residual. O experimento foi realizado em duplicata e a atividade antimicrobiana das amostras foi testada contra a cepa indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. A fórmula utilizada para calcular a atividade residual (AR) por porcentagem foi:

Equação 1:

$$\text{A.R. (\%)} = \frac{\text{Ht}}{\text{Hc}} \times 100$$

Sendo:

Ht: Halo do sobrenadante após tratamento (mm)

Hc: Halo do controle (mm)

A.R: Atividade residual

4.11.2 Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente a refrigeração e congelamento

Alíquotas dos sobrenadantes foram estocadas por 30 dias sob refrigeração (4°C) e congelamento (-20 °C), segundo Motta et al. (2007) com modificações. Em intervalos de 10 dias foi determinada a atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células, o teste foi realizado em triplicata, e a cepa *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 utilizada como indicadora. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas.

4.11.3 Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente às enzimas proteolíticas

Para o teste de estabilidade frente às enzimas proteolíticas, o sobrenadante livre de células obtido através da cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G- 100), foi tratado com as enzimas papaína e tripsina, nas concentrações finais de 2 mg/mL. Para cada enzima testada foram preparados quatro microtubos. Sendo eles: *Tubo 1*: Controle (Enzima proteolítica + tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7), *Tubo 2*: Teste (Enzima proteolítica + substância antimicrobiana), *Tubo 3*: Controle (substância antimicrobiana) - tratado pelo calor, *Tubo 4*: Controle (substância antimicrobiana) – não tratado pelo calor. Após o preparo das alíquotas, esses microtubos foram incubados a 37 °C por 1 hora, em seguida os tubos 1, 2 e 3 foram submetidos ao aquecimento de 100 °C por 3 minutos, para inativação das proteases. Para o experimento foi utilizado o tampão fosfato de sódio 10 mM com pH 7, pois é a faixa de pH ótimo das enzimas testadas. Após cada tratamento, foi determinada a atividade antimicrobiana, em triplicata, utilizando a cepa *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e incubação a 30 °C por 24 horas.

4.12 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado

Os micro-organismos utilizados no espectro de ação são provenientes de amostras ambientais e culturas de coleção, incluindo culturas da coleção da Fiocruz. Para a realização do teste, foram preparadas suspensões de cada um dos micro-organismos indicadores, em solução salina 0,85% contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (de acordo com a escala de turbidez de MacFarland 0,5). Cada uma das suspensões foi espalhada em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Kasvi®) e para as espécies de *Candida* foi utilizado o meio Mueller-Hinton glicose com azul de metileno. Em seguida, foram inoculados 20 µL do sobrenadante livre de células obtido através da G-100, em triplicata, e incubados nas condições ótimas de crescimento de cada micro-organismo indicador (28°C, 30°C ou 37°C) por 24 horas. Após período de incubação foi observada a formação de halos de inibição, os quais foram medidos e expressos em milímetros. Para o teste foram utilizados os seguintes micro-organismos de referência: *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria innocua* ATCC 1572, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus subtilis*

ATCC 19659, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35954, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 35591, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, e micro-organismos de origem ambiental, como: *Listeria monocytogenes* 4B carcaça alimento, *Listeria innocua* 6B alimento, *Listeria monocytogenes* 17D78/03 alimento, *Listeria monocytogenes* 4C alimento, *Listeria innocua* L07 (leite de búfala), *Listeria innocua* L 10 (leite de búfala), *Listeria innocua* L 11 (leite de búfala), *Listeria innocua* L 13 (leite de búfala), *Listeria welshimeri* ou *seeligeri* BQ Oxford 1 (bancada de queijo), *Listeria seeligeri* BP Palcan 2 (Bancada presunto), *Listeria welshimeri* ou *seeligeri* PF Oxford 3 (Presunto fatiado), *Listeria welshimeri* ou *seeligeri* MP Oxford 4 (Mãos presunto), *Listeria seeligeri* ou *innocua* BP Oxford 5 (Bancada presunto), *Listeria monocytogenes* QF Oxford 6 (queijo fatiado), *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Erwinia psidii*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae*. Os micro-organismos foram cultivados em Ágar Triptona de Soja (TSA).

4.12.1 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente a bactérias de importância ambiental

Para a realização do teste, foram preparadas suspensões de cada um dos micro-organismos indicadores, em solução salina 0,85% com uma padronização do inóculo em aproximadamente 10^5 UFC/mL. Após, o teste foi realizado conforme descrito no item 4.12. Os micro-organismos utilizados no teste foram: *Paenibacillus polymyxa*, *Rhizobium radiobacter*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Enterobacter cloacae*. A cepa *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 foi utilizada como controle positivo. Os micro-organismos foram cultivados em ágar BHI (Oxoid®) e/ou ágar YMA (*Yeast Mannitol Agar*) de acordo com a exigência de cada micro-organismo.

5. RESULTADOS

5.1 Análises Físico-Químicas das amostras de sedimento

Das quatro amostras de sedimento coletadas, três foram submetidas à avaliação das suas propriedades físico-químicas (Ponto 1, 2 e 3). Os dados obtidos mostraram que os teores de carbono orgânico variaram entre 3,0% e 4,8%, de acordo com a tabela 1 e verifica-se que o maior valor foi encontrado no ponto 1, e o menor no ponto 2. Em relação à granulometria do sedimento, os teores de argila variaram entre 32 e 40%, enquanto os valores do teor de silte foram bem próximos nos três pontos analisados: ponto 1 com 41% e ponto 2 e 3 com 43%. As maiores porcentagens de areia grossa foram verificadas no ponto 2, com 11% e a menor no ponto 1 com 6%, já para areia fina as maiores porcentagens foram no ponto 1 com 16% e o menor no ponto 3 com 7%. Com relação ao nitrogênio os valores variaram entre 0,25% e 0,48%, o pH variou entre ácido com valor de 5,4, levemente ácido com 6,2 e neutro 7,5. Os maiores valores para umidade foram observados no ponto 1, com 56% e o menor no ponto 2 com 44%.

Tabela 1 – Resultado dos parâmetros físico-químicos analisados nas três amostras de sedimento coletadas na área úmida da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS

Pontos e data das coletas	Carbono Orgânico	Argila	Granulometria		Silte	Nitrogênio	pH	Umidade
			Areia Grossa	Areia Fina				
Ponto 1 24/01/2017	4,8 %	37 %	6 %	16 %	41 %	0,48 %	6,2	56 %
Ponto 2 07/04/2017	3,0 %	32 %	11 %	14 %	43 %	0,25 %	7,5	44 %
Ponto 3 12/05/2017	3,2 %	40 %	10 %	7 %	43 %	0,30 %	5,4	50 %

5.2 Contagem total de bactérias heterotróficas das amostras de sedimento

As coletas de sedimento para contagem das bactérias heterotróficas foram realizadas no outono, em período seco e temperatura em torno de 25°C. Os resultados revelaram valores entre $1,8 \times 10^4$ UFC/g a $5,8 \times 10^4$ UFC/g de sedimento, conforme a tabela 2. As contagens de bactérias heterotróficas nos quatro pontos analisados se mostraram homogêneas.

Tabela 2 – Resultado da quantificação de bactérias heterotróficas por ponto das amostras de sedimento analisadas provenientes da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina, São Leopoldo/RS

Pontos	Unidades Formadoras de Colônias/grama (UFC/ g de sedimento)
1	$2,1 \times 10^4$ UFC/g de sedimento
2	$1,8 \times 10^4$ UFC/g de sedimento
3	$4,5 \times 10^4$ UFC/g de sedimento
4	$5,8 \times 10^4$ UFC/g de sedimento

5.3 Caracterização preliminar e identificação por Maldi-Tof/MS dos isolados bacterianos

A partir do crescimento de colônias em meio ágar triptose de soja, foram escolhidos diferentes morfotipos. No ponto 1, foram selecionados nove isolados bacterianos, enquanto no ponto 2, foram selecionados oito isolados e nos pontos 3 e 4, foram obtidos 10 isolados, para cada ponto, totalizando 37 bactérias. Desses 37 isolados, nove foram caracterizadas como bactérias Gram negativas e 28 bactérias Gram positivas. Em relação à análise por Maldi-Tof/MS, os escores previstos são: 0.000 - 1.699 indicam uma identificação não confiável, escore entre 1.700 - 1.999 como identificação provável do gênero, 2.000 - 2.299, como identificação segura em nível de gênero e 2.300 - 3.000 indica uma identificação segura em nível de espécie. Das 37 colônias bacterianas selecionadas, foi possível a identificação de 13 isolados com identificação segura em nível de gênero e seis isolados bacterianos foram identificados com provável identificação em nível de gênero, conforme a tabela 3. Não foi possível a identificação de nenhum

isolado com identificação segura em nível de espécie e 18 isolados bacterianos não foram identificados.

Tabela 3 – Resultado da identificação dos isolados bacterianos através do Maldi-Tof, usando o banco de dados Biotyper 4.0 *software* MBT OC.

Isolados bacterianos analisados por Maldi Tof	Escore	Escore
	1.700 – 1.999	2.000 – 2.299
<i>Bacillus megaterium</i> sed 1.4	-	2.179
<i>Bacillus megaterium</i> sed 1.5	-	2.163
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> sed 2.1	-	2.072
<i>Staphylococcus</i> sp. sed 2.3	1.815	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 2.4	-	2.038
<i>Rumellibacillus</i> sp. sed 2.5	1.838	-
<i>Micrococcus luteus</i> sed 2.6	-	2.223
<i>Bacillus megaterium</i> sed 2.8	-	2.049
<i>Bacillus</i> sp. sed 3.1	1.829	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.3	-	2.176
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.4	-	2.066
<i>Bacillus</i> sp. sed 3.5	1.840	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.6	-	2.161
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.9	-	2.221
<i>Bacillus megaterium</i> sed 4.2	-	2.029
Sed 4.3	-	-
<i>Bacillus</i> sp. sed 4.4	1.926	-
<i>Bacillus</i> sp. sed 4.8	1.937	-
<i>Paenibacillus</i> sp. sed 4.9	-	2.082
<i>Bacillus megaterium</i> sed 4.10	-	2.117

*Os valores do score são os seguintes: 1.700 - 1.999: identificação provável do gênero, 2.000 - 2.299: identificação segura do gênero.

5.4 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados bacterianos

Os resultados da avaliação da produção de enzimas extracelulares pelos isolados selecionados mostraram que dos 37 isolados testados, 24 (64,86%) degradaram

o amido. A atividade proteolítica foi verificada em 34 isolados, correspondendo a 91,89%, e apenas seis foram capazes de degradar a gelatina, correspondendo à 16,21%. A produção de lipase foi observada em 14 isolados (37,83%), conforme a figura 3.

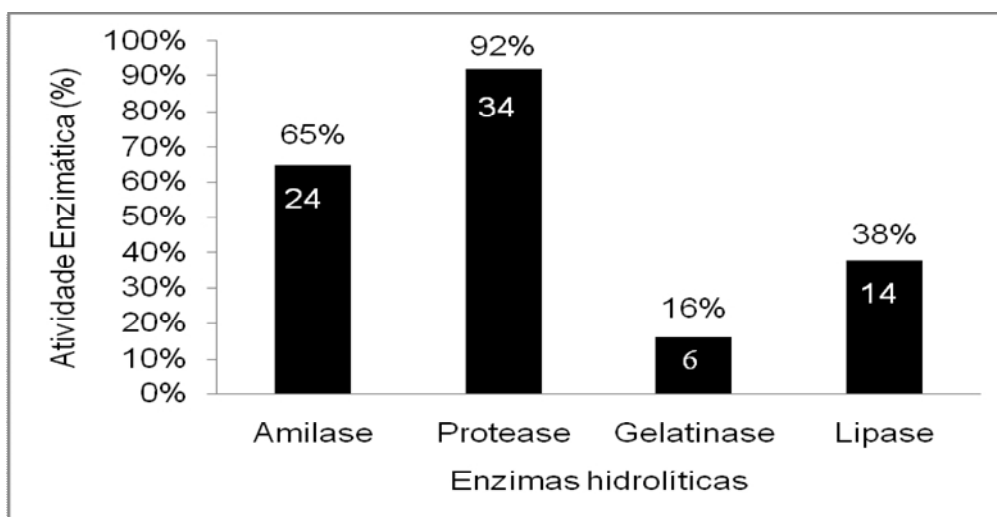


Figura 3 – Percentagem de isolados bacterianos com atividade enzimática, provenientes da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS

Dos 37 isolados bacterianos, apenas 2 (5,40%) foram produtores das quatro enzimas testadas, o isolado *Bacillus* sp. sed 3.5 e sed 4.3. A partir de uma avaliação quantitativa verificou-se que desses 37 isolados apenas seis (16,21%) apresentaram um melhor perfil enzimático, com maior média de halo em pelo menos dois testes (amilase= 16,41 mm e atividade proteolítica= 22,27 mm). Os isolados foram: *Bacillus megaterium* sed 1.5, isolado sed 2.2, *Bacillus megaterium* sed 2.8, *Bacillus* sp. sed 3.5, isolado sed 3.11 e isolado sed 4.3.

A figura 4 A, B e C mostra a formação de halo ao redor do crescimento bacteriano indicando um resultado positivo para os testes de amilase, lipase e protease. A figura 4 D indica um resultado positivo para o teste da gelatinase.

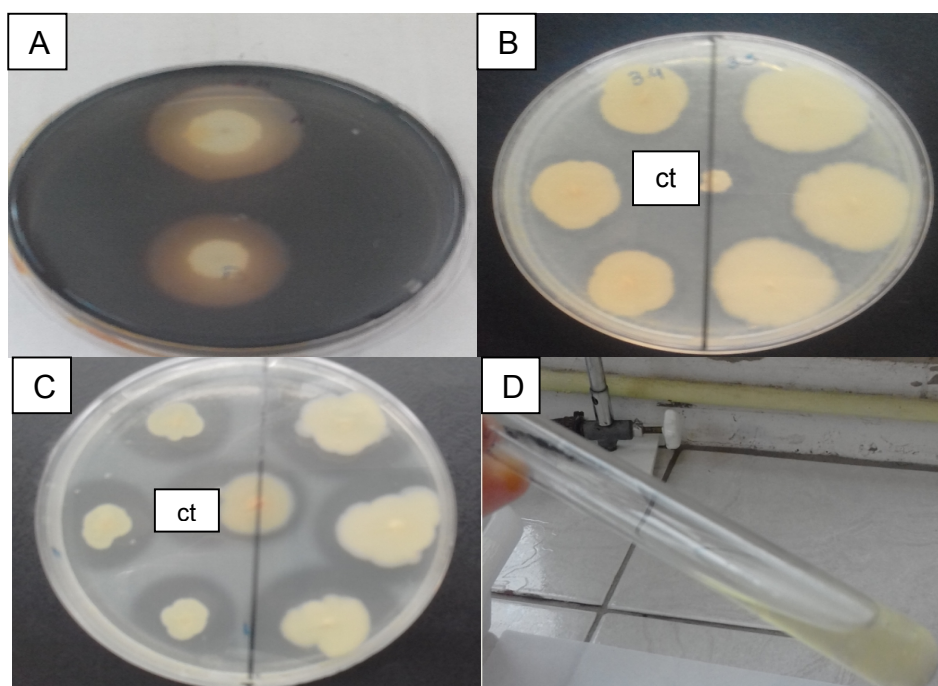


Figura 4 – Resultado dos testes enzimáticos.

A: Formação de halo ao redor da colônia, indicando resultado positivo para a prova da amilase, B: formação de halo ao redor da colônia, indicando resultado positivo para atividade lipolítica, C: formação de halo ao redor da colônia, indicando resultado positivo para atividade proteolítica, e D: degradação da gelatina indicando resultado positivo para gelatinase. ct: controle positivo.

5.5 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelas bactérias selecionadas

5.5.1 Teste da sobrecamada

A capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana foi avaliada em seis isolados bacterianos que apresentaram melhor perfil enzimático (*Bacillus megaterium* sed 1.5, isolado sed 2.2, *Bacillus megaterium* sed 2.8, *Bacillus* sp. sed 3.5, isolado sed 3.11 e isolado sed 4.3) através do teste da sobrecamada. Esse teste revelou a presença de halos de inibição, produzido por apenas uma bactéria, o isolado sed 2.2, apresentando valor de 12 mm, em média, frente à cultura indicadora de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 (figura 5). Não foi observada atividade antimicrobiana contra a cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Diante desse resultado o isolado sed 2.2 foi selecionado para as demais etapas do trabalho.

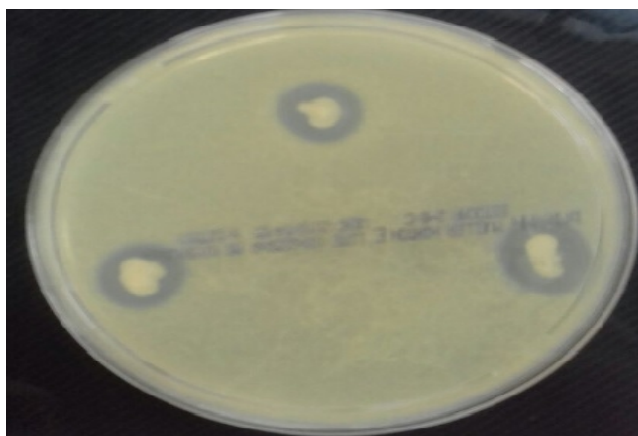


Figura 5 – Teste da sobrecamada realizado com o isolado sed 2.2, utilizando a cepa *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, como indicadora

5.5.2 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas pelo Método de Difusão em Ágar com Discos

Diante dos resultados do teste da sobrecamada, o isolado sed 2.2 que apresentou atividade antimicrobiana contra a cepa indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 foi selecionado para o teste de Difusão em Ágar com Discos. O sobrenadante livre de células com pH 7,0 foi testado frente às culturas indicadoras de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. A atividade antimicrobiana foi novamente observada apenas frente à cepa de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, com 100 UA/mL.

5.6 Identificação do isolado sed 2.2 pelo gene 16S rRNA

O isolado sed 2.2 demonstrou uma correspondência de pelo menos 99% com as sequências dos gêneros *Bacillus* e *Fictibacillus*, porém o gênero *Fictibacillus* apareceu apenas uma vez com as demais sequências do banco de dados. Deste modo o isolado sed 2.2 foi identificado como *Bacillus* sp. sed 2.2 com o código MH666075 no *Standard Nucleotide BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os demais microorganismos com os quais houve a correspondência do isolado sed 2.2, são bactérias essencialmente pertencentes ao gênero *Bacillus*, não sendo possível a identificação

em nível de espécie por esta metodologia.

5.7 Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. sed 2.2 e produção da substância antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do isolado *Bacillus* sp. sed 2.2, foi inicialmente detectada na fase de crescimento exponencial e a atividade máxima foi observada do início ao final da fase estacionária, tendo um maior intervalo de produção da atividade antimicrobiana entre 33 e 48 horas (figura 6), com 100 UA/mL. O pH manteve-se em 7,0 durante todo o cultivo. A bactéria indicadora utilizada nesse experimento foi *Corynebacterium fimi* NCTC 7547.

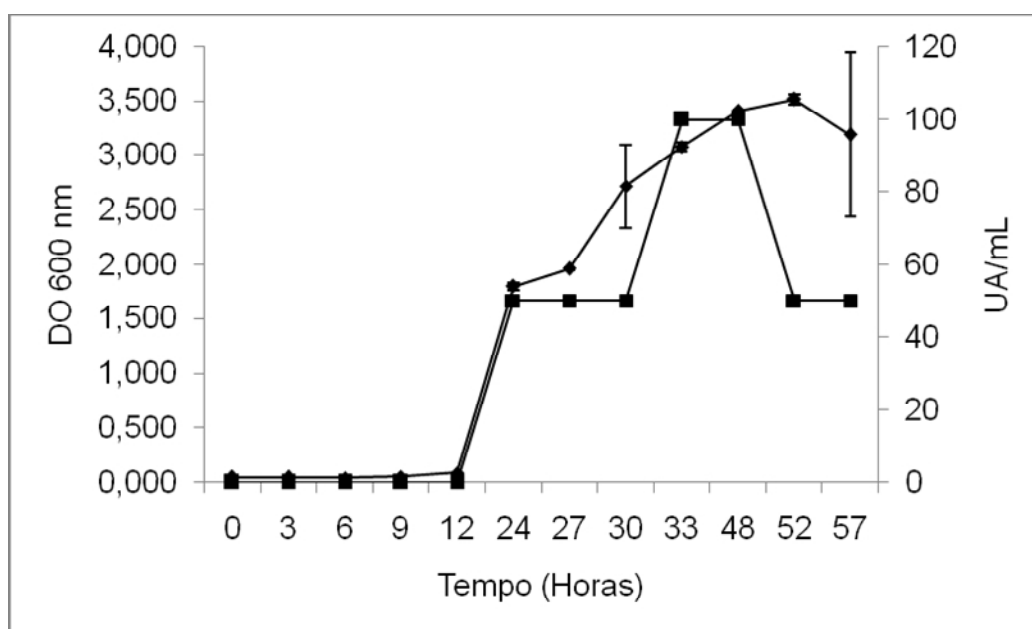


Figura 6 – Curva de crescimento do isolado bacteriano *Bacillus* sp. sed 2.2 e produção de atividade antimicrobiana. A densidade óptica (♦) e a atividade antimicrobiana foram (■) monitoradas.

5.8 Purificação parcial do sobrenadante bruto

5.8.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

De acordo com a figura 7, observa-se que a faixa que apresentou uma melhor recuperação da atividade antimicrobiana foi a faixa de saturação de 0-60%, com 800 UA/mL. No entanto, no extrato bruto e na faixa de saturação de 0-20% observa-se uma considerável atividade, com 400 UA/mL para cada um, e na faixa de 20-40% o valor reduziu para 200 UA/mL. A partir desses dados, decidiu-se que para dar continuidade às próximas etapas do trabalho, a faixa de saturação seria de 0-60% pois a atividade não ficou concentrada em apenas uma faixa de saturação do sulfato de amônio.

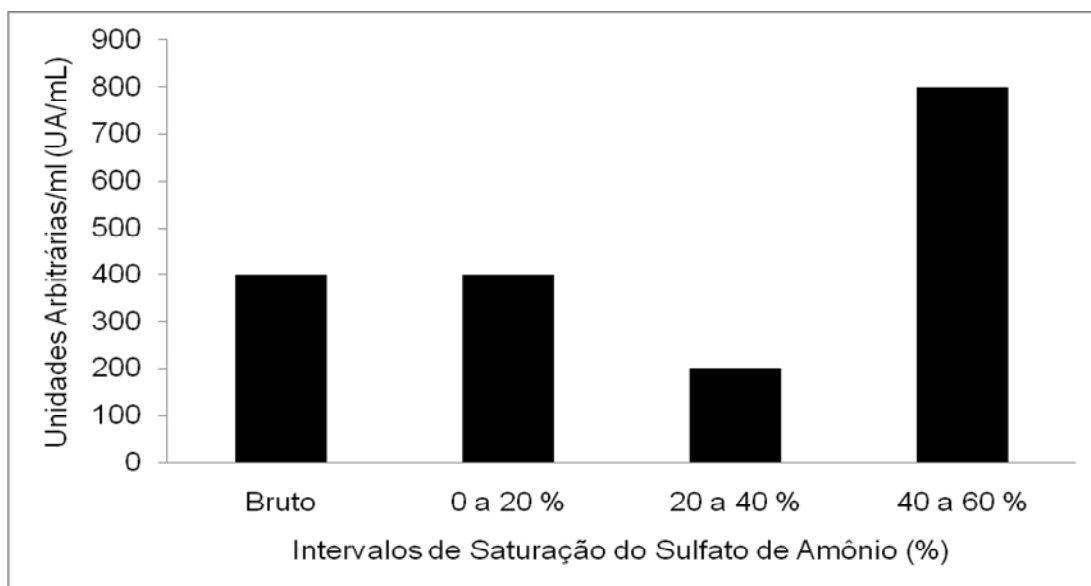


Figura 7 – Resultados da precipitação fracionada com sulfato de amônio com a atividade antimicrobiana (UA/mL) dos sobrenadantes de cada precipitado e os diferentes intervalos de saturação do sulfato de amônio do isolado *Bacillus* sp. sed 2.2

5.8.2 Cromatografia Líquida de Gel Filtração (Sephadex G - 100)

A figura 8 ilustra o perfil de eluição da amostra, obtida após a purificação por cromatografia líquida de gel filtração, utilizando uma coluna Sephadex G -100, tipo Dextrana e equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0. As frações que apresentaram atividade antimicrobiana após a liofilização foram 6, 7, 8, 9 e 10, com o

valor de 50 UA/mL para cada uma das frações. A absorvância a 280 nm variou entre 0,378 a 0,602. O pH manteve-se em 7,0.

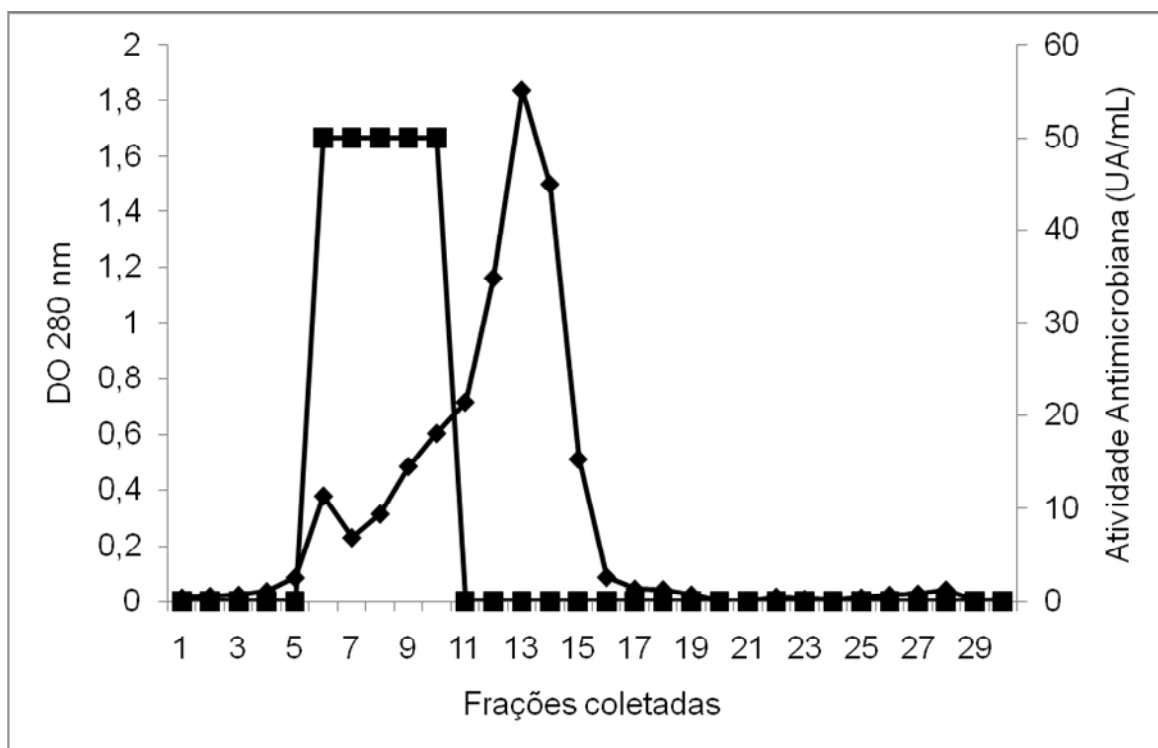


Figura 8 – Perfil de eluição do precipitado (0 – 60%) em coluna de gel filtração Sephadex G – 100. A absorvância a 280 nm (♦) e a atividade antimicrobiana em UA/ mL (■) foram determinadas para cada fração coletada.

5.8.3 Membrana de Ultrafiltração do sobrenadante bruto parcialmente purificado

A alíquota com atividade antimicrobiana gerada após a cromatografia líquida de gel filtração (G- 100) foi fracionada por ultrafiltração e duas frações foram obtidas (filtrado e retido). A atividade antimicrobiana foi observada no retido, com halos de 5 mm em média. Essa fração contém peptídeos com peso molecular > 30 Kda. Esses resultados indicam que a substância ativa tem massa molecular estimada maior que 30 Kda.

5.8.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante bruto parcialmente purificado

Os resultados obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida estão apresentados na figura 9. Observa-se o perfil protéico das frações obtidas (extrato bruto, precipitado e cromatografia líquida de gel filtração) e os padrões de banda. A seta indica o possível peptídeo parcialmente purificado com massa molecular de aproximadamente 36,5 Kda.

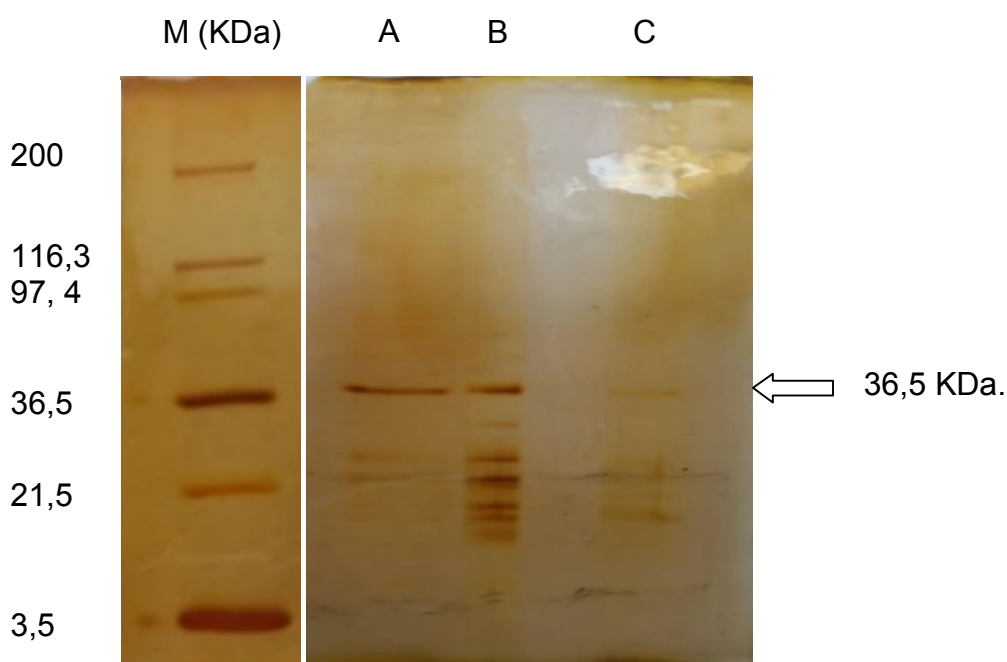


Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da substância antimicrobiana do isolado *Bacillus* sp. sed 2.2. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE e coradas com prata para verificação das bandas de proteína. M: marcador de proteína, A: extrato bruto, B: precipitado, C: cromatografia líquida de gel filtração Sephadex (G- 100).

5.8.5 Quantificação de proteínas totais do sobrenadante bruto parcialmente purificado

Observa-se na tabela de purificação (tabela 4) que a substância antimicrobiana estudada apresentou pouca atividade no extrato bruto e na cromatografia líquida de gel filtração (50 UA/mL). A atividade específica foi maior no precipitado (PPT), seguido da cromatografia líquida de gel filtração.

Tabela 4 – Dados da purificação mostrando as frações obtidas nos diferentes passos da purificação da substância antimicrobiana produzida pelo isolado *Bacillus* sp. sed 2.2

	UA/mL	Vol/mL	UA total	Proteína/mL	Atividade Específica
EXTRATO BRUTO	50	300	15.000	0,549	91,07
PPT	200	1	200	0,568	352,11
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE GEL FILTRAÇÃO	50	4	200	0,379	131,92

5.9 Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado

5.9.1 Estabilidade térmica do sobrenadante bruto parcialmente purificado

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana após a cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-100) foram reunidas em um *pool* (frações 6, 7, 8, 9 e 10) e testadas quanto à estabilidade térmica. O sobrenadante bruto parcialmente purificado manteve-se estável a 100 °C por 3, 5 e 10 minutos (figura 10).

Quando o sobrenadante bruto parcialmente purificado foi submetido ao tempo de 15 minutos por 100 °C a atividade foi completamente inativada. Esses resultados se mostraram iguais quando a substância foi submetida à temperatura de 121 °C por 15 minutos (autoclave), onde a substância também foi completamente inativada.

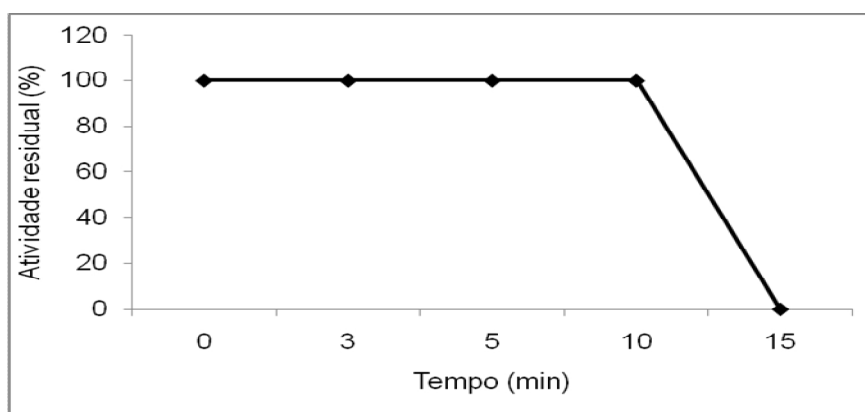


Figura 10 – Estabilidade térmica da substância antimicrobiana parcialmente purificada produzida pelo isolado *Bacillus* sp. sed 2.2 após incubação por 100 °C em diferentes intervalos de tempo em relação ao controle.

5.9.2 Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente à refrigeração e congelamento

O sobrenadante bruto parcialmente purificado após ser refrigerado a temperatura de 4°C por um período de 10 dias mostrou-se instável, sua atividade foi completamente inativada. O sobrenadante bruto parcialmente purificado se manteve estável quando congelado a -20 °C por um período de 40 dias.

5.9.3 Estabilidade do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente às enzimas proteolíticas

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana após a cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-100) foram reunidas em um *pool* (frações 6, 7, 8, 9 e 10) e testadas frente às enzimas proteolíticas. A substância estudada se mostrou sensível às enzimas (papaína e tripsina) na concentração final de 2mg/mL. Esses resultados sugerem que o composto seja de natureza protéica.

5.10 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram reunidas em um *pool* (frações 6, 7, 8, 9 e 10) e testadas contra diversos micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. A medição dos halos de inibição está demonstrada na tabela 5. Foi verificada atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e patogênicas como algumas espécies de *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes*, que é um importante patógeno de origem alimentar. No entanto, não foi observada inibição das bactérias Gram-negativas e nem de leveduras. Na tabela 5, constam apenas os isolados bacterianos que foram sensíveis a substância antimicrobiana testada.

Tabela 5 – Espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido pelo isolado *Bacillus* sp. sed 2.2, com a média dos halos de inibição em milímetros (mm)

Culturas indicadoras	Medição dos halos em (mm)
Gram Positivas	
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	9
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> BQ Oxford – 1 (Bancada de queijo)	10,5
<i>Listeria seeligeri</i> BP Palcan – 2 (Bancada presunto)	9
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> PF Oxford – 3 (Presunto fatiado)	9
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> MP Oxford – 4 (Mãos presunto)	7
<i>Listeria seeligeri</i> ou <i>innocua</i> BP Oxford – 5 (Bancada presunto)	9

5.10.1 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado frente a bactérias de importância ambiental

O *pool* com as frações que apresentaram atividade antimicrobiana também foi testado contra algumas bactérias de importância ambiental, contudo não foi observada atividade antimicrobiana em nenhuma das bactérias testadas, observando-se um resultado negativo.

As bactérias fixadoras do nitrogênio não foram inibidas pela substância antimicrobiana, indicando um bom resultado, pois estes micro-organismos são essenciais no ciclo do nitrogênio.

6. DISCUSSÃO

As áreas úmidas são importantes ecossistemas, ricos em matéria orgânica e biodiversidade (FZB, 2012). Estudos já demonstraram que fatores como matéria orgânica, nitrogênio total, nitrogênio inorgânico, demanda química de oxigênio (DQO) e pH são fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana do solo (Ansola et al., 2014, Ligi et al., 2014, Arroyo et al., 2015, Ding et al., 2015) e que diferentes fatores ambientais podem influenciar as distribuições espaciais das comunidades microbianas (Ding et al., 2015). Nesse trabalho foram isolados 37 micro-organismos, e através do Maldi-tof foi possível identificar 19 isolados em nível de gênero. A partir desses resultados, foi observado que o gênero *Bacillus* foi predominante nas amostras de sedimento analisadas, pois 40% dos isolados identificados pertencem a esse gênero.

Diferentes estudos já demonstraram que esse micro-organismo é frequentemente isolado de amostras ambientais, incluindo solo. Zhang et al. (2015) analisaram comunidades microbianas em sedimentos da rizosfera, e os resultados mostraram que o gênero *Bacillus* foi o mais dominante. Femi-Ola et al. (2015), ao estudarem amostras de solo, também constataram que o gênero *Bacillus* era um dos mais dominantes nas amostras analisadas. Panosyan et al. (2018) analisaram a composição da comunidade bacteriana de um solo e a maioria dos gêneros bacterianos encontrados foram *Halobacillus* (41,2%), *Piscibacillus* (23,5%), *Bacillus* (23,5%) e *Virgibacillus* (11,8%).

Recentemente outros gêneros têm sido encontrados em amostras de sedimento, como é o caso do *Fictibacillus*. Wang et al. (2018) isolaram esta bactéria a partir de sedimento, com base na sequência do gene 16S rRNA o isolado S38T foi agrupado neste gênero. A partir de uma amostra de sedimento marinho, Dastager et al. (2014) isolaram uma bactéria designada NIO-1003T e com base nas propriedades fenotípicas e na análise filogenética do gene 16S rRNA, considerou-se que este isolado representava uma nova espécie do gênero *Fictibacillus* para o qual o nome *Fictibacillus enclensis* sp. nov. foi proposto.

Durante muito tempo, as bactérias aeróbicas, formadoras de endósporos e em forma de bastonete, foram classificadas no gênero *Bacillus*. Após as análises de sequências baseadas no gene 16S rRNA, descobriu-se que este gênero continha vários grupos distintos filogeneticamente (Nielsen et al., 1995). Glaeser et al. (2013) propuseram uma reclassificação de alguns grupos, incluindo *Fictibacillus*, que foi classificado como um

novo gênero. Até o momento este gênero compreende dez espécies (Wang et al., 2018).

A espectrometria de massa é uma ferramenta precisa e rápida para identificação de isolados bacterianos na área clínica. Contudo, sua aplicação em um contexto ecológico, considerando as bactérias de origem ambiental, ainda é limitada (Hausdorf et al., 2013). Entretanto, alguns pesquisadores vêm empregando esta ferramenta para identificação de bactérias ambientais. Das 45 bactérias isoladas de um ambiente marinho, Timperio et al. (2017) identificaram 16 bactérias em nível de espécie e 23 com identificação segura em nível de gênero. De certa forma, os resultados apresentados por este pesquisador foram bons se comparados com os resultados de outros pesquisadores. Lovecka et al. (2015) isolaram bactérias de solo contaminado e dos sete isolados bacterianos estudados, três tiveram sua classificação como segura em nível de gênero. Kopcakova et al. (2014) buscaram identificar bactérias isoladas de resíduos industriais, dos 29 isolados bacterianos, 27,58% tiveram identificação segura para gênero e 31% como provável identificação de gênero. Os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes aos encontrados por outros pesquisadores, pois nenhum isolado foi identificado com segura identificação em nível de espécie e menos de 50% foram identificados com identificação segura do gênero.

Devido a essa dificuldade de identificação que vários pesquisadores enfrentam principalmente ao que se refere ao gênero *Bacillus*, outras ferramentas vêm sendo empregadas na identificação de bactérias ambientais, outros genes estão sendo utilizados, como *recA*, *rpoB*, *gyrB*, como um método alternativo para a diferenciação de espécies de *Bacillus* (Mohkam et al., 2016). Além do mais, o gênero *Bacillus*, contém várias espécies estreitamente relacionadas, cuja identificação é difícil (Starostin et al., 2015). Um exemplo são as espécies de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*, que possuem sequências do gene 16S rRNA altamente semelhantes, o que torna difícil a identificação com base na análise deste gene. Outro exemplo é o grupo do *Bacillus cereus*, que inclui *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis*, que são geneticamente muito semelhantes, porém, são consideradas espécies separadas devido à patogenicidade (Rasko et al., 2005).

A bactéria *Bacillus* sp. sed 2.2, isolada do ponto 2 da área úmida coletada, foi estudada quanto ao seu potencial de produção de compostos bioativos e enzimas hidrolíticas, observando-se o potencial deste isolado bacteriano quanto a sua atividade enzimática. Correia et al. (2014) avaliaram o potencial enzimático de bactérias isoladas de

sedimento de um manguezal, aproximadamente 60% dos seus isolados apresentaram atividade amilolítica e 26% atividade lipolítica, resultados bem próximos aos encontrados nesse estudo, onde 64% dos isolados apresentaram atividade amilolítica e 37% atividade lipolítica. Castro et al. (2014) isolaram bactérias endofíticas em áreas distintas de manguezais no estado de São Paulo e investigaram a produção de enzimas de interesse industrial, como amilase, endoglucanase, esterase, lipase e protease. As atividades enzimáticas foram observadas em 45% dos isolados para a produção de amilase, 62,5% atividade endocelulolítica, 17,5% de esterase, 52,5% lipase e 75% protease.

As bactérias de origem ambiental têm diversas aplicações e vários estudos já demonstraram seu potencial antimicrobiano. A substância estudada teve sua atividade antimicrobiana inicialmente detectada na fase de crescimento exponencial e a atividade máxima observada do início ao final da fase estacionária (entre 33 e 48 horas), com 100 UA/mL. Porém com 52 horas de cultivo, houve uma diminuição da produção da atividade antimicrobiana, reduzindo para 50 UA/mL. No trabalho de Liu et al. (2015), a cepa de *Bacillus subtilis* EMD4 produziu uma substância antimicrobiana e a partir da curva de crescimento foi possível constatar que a atividade antimicrobiana mostrou um maior pico de produção entre 36 e 60 horas, com 320 UA/mL, e uma redução de 50% nas UA/mL com 72 horas de produção. A partir de uma amostra de solo, Embaby et al. (2014) isolaram um *Bacillus* sp. YAS 1 produtor de uma substância antimicrobiana. O registro do início da produção dessa substância se deu na fase exponencial e um aumento durante a fase estacionária de crescimento, atingindo seu pico máximo com 62 horas de cultivo. Esses resultados sugerem que a substância trata-se de um metabólito secundário.

O peptídeo antimicrobiano estudado neste trabalho foi parcialmente purificado com uma combinação de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração e ultrafiltração. Os resultados obtidos sugerem que o rendimento máximo dessa substância foi na concentração de 60% de sulfato de amônio, resultados semelhantes foram encontrados por Alanazi et al. (2016) e Lim et al. (2016). De acordo com a ultrafiltração, o peptídeo antimicrobiano estudado tem peso molecular superior a 30 KDa. Estes resultados são consistentes com a banda de 36,5 KDa observada no gel SDS-PAGE. Ayed et al. (2015), ao utilizarem a técnica de SDS-PAGE para estimar o tamanho de uma substância produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, conseguiram aferir que a substância possuía massa molecular de 11 KDa, sendo considerado um peptídeo pequeno. Outros autores ao utilizarem a mesma técnica encontraram massas moleculares

maiores nos peptídeos estudados. Shi et al. (2015) avaliaram uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus subtilis* encontrando massa molecular de 54 KDa.

Algumas propriedades físico-químicas da substância antimicrobiana produzida pelo isolado *Bacillus* sp sed 2.2 foram estudadas, como a estabilidade térmica e a estabilidade frente a enzimas proteolíticas. Não houve inativação térmica a 100 °C por 3, 5 e 10 minutos. Quando a substância foi submetida a 100 °C e a 121 °C (autoclave) por 15 minutos a sua atividade foi inativada completamente. Chalasani et al. (2015) trabalharam com uma substância produzida por *Bacillus* sp. que foi estável a diferentes temperaturas, mantendo 80% de sua atividade a 80 °C por 1 hora, 75% da atividade a 100 °C por 30 minutos e quando submetida a 121 °C por 15 minutos (autoclave) a atividade se manteve em 60%. Em relação à termoestabilidade de um lipopeptídeo produzido por *Bacillus methylotrophicus*, essa substância se mostrou resistente ao aquecimento por 20 minutos a temperaturas de até 100 °C, mantendo 100% de sua atividade antimicrobiana inicial (Jemil et al., 2017). Lisboa et al. (2006) estudaram uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* que foi submetida a diferentes temperaturas. Ela foi estável a temperaturas de até 80°C, e sua atividade residual diminuiu quando exposta a temperatura de 100°C em diferentes intervalos de tempo. Alguns autores relataram que muitas bacteriocinas perdem sua estabilidade ao calor após a purificação (Kamoun et al., 2005; Smaoui et al., 2010).

A atividade antimicrobiana da substância estudada foi sensível às proteases testadas (papaína e tripsina), indicando que o composto seja de natureza protéica. O sítio de clivagem da tripsina é altamente específico, clivando a ligação peptídica após resíduos com longas cadeias laterais de carga positiva, arginina e lisina (Berg et al., 2014). Bacteriocinas que não apresentam sensibilidade à tripsina, provavelmente não apresentam sítio lítico para essa protease. Algumas bacteriocinas produzidas por *Bacillus* sp. são sensíveis a tripsina e a papaína, tais como: LBM 5006 (Lisboa et al., 2006), NS02 (Senbagam et al., 2013), N2-4 sensível à tripsina (Boottanum et al., 2017), RX 7 sensível à tripsina (Lim et al., 2016). Também observam-se compostos que são parcialmente sensíveis às proteases, como a bacteriocina produzida por *Bacillus cereus* BLIS m6c e BLIS m387 (Minnaard & Alippi, 2016), N3-8 (Boottanum et al., 2017), BLS P34 (Motta et al., 2007).

O peptídeo antimicrobiano caracterizado neste estudo foi testado contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, incluindo importantes patógenos.

A substância estudada inibiu o crescimento de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, que é descrita como sensível a todas as bacteriocinas já testadas (Oliveira et al., 1998) e alguns isolados de *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes*. No entanto, a substância não foi capaz de inibir bactérias Gram negativas e leveduras, demonstrando um espectro de ação mais restrito, concordando com o fato de que é mais difícil as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas inibirem o crescimento de bactérias Gram-negativas devido às diferentes estruturas que estão presentes na parede celular (Liu et al., 2015). O peptídeo antimicrobiano estudado por Lee & Chang (2018) foi testado contra uma gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e os resultados obtidos mostraram que a substância foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas como *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. Torres et al. (2015) também encontraram atividade antimicrobiana contra cepas de *Listeria monocytogenes*. Diante dos resultados apresentados até o momento sugere-se que a substância possa ser uma bacteriocina da classe IIa, uma bacteriocina do tipo antilisterial, e o seu tamanho grande pode estar associada ao fato da molécula estar em aglomerados.

Doenças transmitidas por alimentos contaminados estão entre as principais causas de mortalidade em todo o mundo, sendo responsáveis por 20 milhões de casos por ano (Pal et al., 2016). A infecção alimentar ocorre por patógenos bacterianos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli* e a intoxicação alimentar pode ser causada por *Staphylococcus aureus*, ou por suas toxinas (Kadariya et al., 2014; Saraoui et al., 2016). A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria psicrotrófica, patogênica oportunista com grande significado na saúde pública, pois gera um impacto econômico significativo. Os custos com a listeriose são altíssimos podendo chegar a mais de um bilhão de dólares por ano (Saraoui et al., 2016; Ünlü et al., 2016).

O método mais comum utilizado na preservação de alimentos é o uso de aditivos alimentares ou conservantes, que são principalmente produtos químicos prejudiciais (Pandey et al., 2014). Por esta razão, o uso de bacteriocinas para inibir patógenos de origem alimentar já é descrito, porém, somente a nisina é comercialmente disponível. De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2001), o padrão estabelecido é a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de alimento. Diante do exposto, o peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus* sp. sed 2.2, mostrou um importante potencial antibacteriano, inibindo *Listeria monocytogenes*.

O peptídeo antimicrobiano também foi testado contra bactérias de importância

ambiental, incluindo fitopatógenos e bactérias fixadoras de nitrogênio, observando-se um resultado negativo. Contudo, verifica-se um resultado bom, pois as bactérias fixadoras do nitrogênio não foram inibidas pela substância antimicrobiana, estes micro-organismos são essenciais no ciclo do nitrogênio. Muitas espécies de *Bacillus* possuem características que as tornam adequadas para aplicações agrícolas, sendo bons candidatos para agentes de biocontrole de fitopatógenos (Mora et al., 2015). Estudos recentes também demonstraram que algumas espécies de *Paenibacillus* são ótimas fontes de peptídeos antimicrobianos (Eastman et al., 2014; Cochrane & Vederas, 2016). A atividade antimicrobiana de isolados de *Bacillus* foi testada contra patógenos de plantas na pesquisa de Mora et al. (2015) e foi observada uma inibição nas bactérias *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium radiobacter*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro dos achados de Minnard & Alippi (2016) que, ao testarem um composto antimicrobiano produzido por *Bacillus cereus*, não encontraram atividade contra as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e nem contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

A descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana tornou-se um tema importante nos últimos anos, visto que muitas substâncias possuem aplicações em diversos setores como na indústria alimentícia, farmacêutica ou agricultura. Estudar as propriedades e a aplicabilidade destes compostos abre uma janela de estudo importante considerando a prospecção de novas moléculas com atividade biológica de interesse.

7. CONCLUSÃO

Em relação às amostras de sedimento coletadas, embora este trabalho não tenha prospectado a diversidade de bactérias em áreas úmidas, não foram observados muitos gêneros bacterianos diferentes. O gênero *Bacillus* mostrou-se como predominante nas amostras estudadas.

O Maldi-tof não foi uma boa ferramenta para identificação dos isolados bacterianos e o gene 16S rRNA não foi discriminatório para identificar o Isolado sed 2.2 em nível de espécie. Sendo assim, o gênero *Bacillus* necessita de outras ferramentas moleculares para identificação.

Os isolados bacterianos selecionados foram produtores de todas as enzimas hidrolíticas estudadas neste trabalho: proteases, lipases, amilases e gelatinase;

Verificou-se que a bactéria selecionada *Bacillus* sp sed 2.2, produz uma substância antimicrobiana, produzida como um metabólito secundário, que possui um restrito espectro de ação, tendo efeito sobre algumas espécies de *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes*, o que sugere que a substância possa ser uma bacteriocina da classe IIa, uma bacteriocina do tipo antilisterial. A substância não inibiu fitopatógenos e nem as bactérias fixadoras do nitrogênio.

A quantidade de atividade antimicrobiana foi considerada pequena, e sugere-se que outros meios de cultivo, incluindo subprodutos da indústria, possam ser implementados para a otimização da produção desta atividade antimicrobiana.

A purificação parcial da substância foi possível por meio de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração e ultrafiltração. A substância estudada é termoestável e de natureza protéica, com tamanho de 36,5 KDa.

Mais estudos são necessários para que se possa purificar esta substância totalmente e avaliar a possibilidade de aplicação na área de alimentos, considerando a sua ação frente a uma bactéria de importância como *Listeria monocytogenes*.

8. REFERÊNCIAS

- Abdel-Mohsein H, Sasaki T, Tada C, Nakai Y. 2011. Characterization and partial purification of a bacteriocin-like substance produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* H1 isolated from cow manure compost. *Anim. Sci. J.* 82(2): 340-350
- Adrio JL & Demain AL. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules.* 4:117–139
- Alanazi AS, Qureshi KA, Elhassan GO, and EL-Agamy EI. 2016. Isolation, Purification and Characterization of Antimicrobial Agent Antagonistic to *Escherichia coli* ATCC 10536 Produced by *Bacillus pumilus* SAFR-032 Isolated from the Soil of Unaizah, Al Qassim Province of Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 19 (5): 191-201
- Anandharaj M, Sivasankari B, Siddharthan N, Rani RP, Sivakumar S. 2016. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metallo-protease from novel *Bacillus alkalitelluris* TW13 isolated from tannery waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 178: 1666–1686.
- Ansola G, Arroyo P, Miera LES. 2014. Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. *Science of the Total Environment.* 473–474, 63-71
- Arqués JL, Rodríguez E, Nunez M, Medina M. 2011. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in Milk. *Food Control* 22:457- 461
- Arroyo P, Saenz De Miera, LE, Ansola G. 2015. Influence of environmental variables on the structure and composition of soil bacterial communities in natural and constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 506: 380–390
- Arumugam T, Kumar PS, Kameshwar R, Prapanchana K. 2017. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. *Microbial Pathogenesis.* 107: 225 – 233
- Zelter F, Letti MS, Zanini D. 2012. **Atlas Socio Ambiental de São Leopoldo.** 224p.
- Ayed HB, Maale H, Hmidet N, Nasri M. 2015. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 3: 255–261
- Bagley CP. 2014. Potential role of synthetic AMPs in animal health to combat growing concerns of antibiotic resistance - a review. *Wyno Acad J Agri Sci* 2(2):19–2
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E1621–E1630. 10.1073/pnas.1218984110

- Bédard F, Biron E. 2018. Recent Progress in the Chemical Synthesis of Class II and S-Glycosylated Bacteriocins. *Frontiers in Microbiology*. 9:1048
- Bennallack PR, Burt SR, Heder MJ, Robison RA, Griffiths JS. 2014. Characterization of a novel plasmid-borne thiopeptide gene cluster in *Staphylococcus epidermidis* strain 115. *J Bacteriol*, 196: 4344-4350
- Berg JM, Tymoczki JL, Stryer L. 2014. **Bioquímica**. 7^a. Ed. 1912 p.
- Berglund N, Piggot T, Jefferies D, Sessions R, Bond P, Khalid S. 2015. Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin b1 with both membranes of *E.coli*: a molecular dynamics study. *PLoS Comput Biol*. doi:10.1371/journal.pcbi.1004180
- Bhunja AK, Johnson MG. 1992. A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*. 15: 5-7
- Bibi F, Ullah I, Alvi SA, Bakhsh SA , Yasir M, Al-Ghamdi AAK, Azhar EI. 2017. Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*. 16 (2): gmr16029657
- Bodelier PLE, Dedysh SN. 2013. Microbiology of wetlands. *Frontiers in Microbiology*. 4:79
- Boottanun P, Potisap C, Hurdle JG, Sermswan RW. 2017. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*. 7:16
- Brady NC, Weil RR. 2013. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. 3 edição. Ed Artmed, 716 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasil, n. 7-E, p. 46-53, 10 jan. 2001. Seção I
- Castro RA, Quecine MC, Lacava PT, Batista BD, et al. 2014. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *Springerplus* 3: 382. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-382>
- Chalasanani AG, Dhanarajan G, Nema S, Sen R, Roy U. 2015. An Antimicrobial Metabolites from *Bacillus* sp.: Significant Activity Against Pathogenic Bacteria Including Multidrug-Resistant Clinical Strains. *Frontiers in Microbiology*.6:1335. doi:10.3389/fmicb.2015.01335
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R. 2015b. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review. *Front. Microbiol*. 6:780. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780

- Cochrane AS & Vederas JC. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev* 36: 4–31
- Contesini FJ, Melo RR, Sato HH. 2017. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 10.1080/07388551.2017.1354354
- Correia JLA, Dos Santos TR, Da Silva AA, Marques OM. 2014. Isolamento, identificação e avaliação do potencial enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da Lagoa do Araça – PE. 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1127-20849-180947.pdf>> Acesso em 15 jun. 2018
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11(2):95–105
- Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. 2013. The future of peptide-based drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* 81: 136-147
- Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, Foster S, Gilmore BF, Hancock REW, Harper D, Henderson IR, Hilpert K, Jones BV, Kadioglu A, Knowles D, Olafsdottir S, Payne D, Projan S, Shaunak S, Silverman J, Thomas CM, Trust TJ, Warn P, Rex JH. 2016. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 16(2):239–251
- Dastager SG, Mawlankar R, Srinivasan K, Tanq SK, Lee JC, Ramana W, Shouche YS. 2014. *Fictibacillus enclensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105:461–469
- De Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BP, Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends Plant Sci.* 20 – 91-101
- De Vuyst L, Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13:194–199
- Deng Y, Cui X, Hernández M, Dumont MG. 2014. Microbial Diversity in Hummock and Hollow Soils of Three Wetlands on the Qinghai-Tibetan Plateau Revealed by 16S rRNA Pyrosequencing. Gilbert JA, ed. *PLoS ONE*. 9(7):e103115
- Ding X, Peng XJ, Jin BS, Xiao M, Chen JK, Li B, Fang CM, Nie M. 2015. Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in a beach wetland of the largest freshwater lake in China. *Front. Microbio.* 6:129
- Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semiautomatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificação discrepantes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- Dutta S, Park YS, Park K. 2016. Proteolytic activity of thermophilic *Bacillus licheniformis* strain SF5-1 for the efficient bioconversion of pork waste to amino acid fertiliser. *Int. Biodeter. Biodegr.* 111: 31-36
- Eastman AW, Heinrichs DE, Yuan Z-C. 2014. Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant growth promotion and competitiveness. *BMC Genom* 15, 851
- Embaby AM, Heshmat Y, Hussein A, Marey HS. 2014. A Sequential Statistical Approach towards an Optimized Production of a Broad Spectrum Bacteriocin Substance from a Soil Bacterium *Bacillus* sp. YAS 1 Strain. *The Scientific World Journal.* 2014:396304
- Femi-Ola TO, Oluwole OA, Olowomofe TO, Yakubu H. 2015. Isolation and screening of biosurfactant-producing bacteria from soil contaminated with domestic waste water. *British Journal of Environmental Sciences* 3:1 – 58-63
- Frazier WC, Rupp P. 1928. Studies on the proteolytic bacteria of milk: a medium for the direct isolation of caseolytic milk bacteria. *Journal of Bacteriology.* 16:57-63
- Fundação Zoo Botânica. **FZB.** Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/conteudo/1057/?Banhados_do_Rio_Grande_do_Sul_abrigam_diversidade_de_fauna_e_flora> Acesso em 06 maio 2018
- Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology.* 113(1):1–15
- Garcia-Fraile P, Menendez E, Rivas R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng.* 2, 183–205
- Ghani M, Ansari A, Aman A, Zohra RR, Siddiqui NN, UI Qader SA. 2013. Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 26(4): 691-697
- Glaeser SP, Dott W, Busse HJ, Kämpfer P. 2013. *Fictibacillus phosphorivorans* gen. nov., sp. nov. and proposal to reclassify *Bacillus arsenicus*, *Bacillus barbaricus*, *Bacillus macauensis*, *Bacillus nanhaiensis*, *Bacillus rigui*, *Bacillus solisalsi* and *Bacillus gelatini* in the genus *Fictibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63(8):2934-44
- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3272-3282
- Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. 2015. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front Microbiol.* 6:1418

- Hammami I, Triki MA, Rebai A. 2011. Purification and characterization of the novel bacteriocin IH7 with antifungal and antibacterial properties. *J. Plant Pathol.* 93 443–454
- Hankin L, Anagnost Akis, SL. 1975. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycological Society of America.* 67: (3) 597-607
- Hassan M, Kjos, M, Nes, IF, Diep DB, Lotfipour F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113(4): 723–736
- Hausdorf L, Mundt K, Winzer M, Cordes C, Fröhling A, Schlüter O, Klocke M. 2013. Characterization of the cultivable microbial community in a spinach processing plant using MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 34 (2), 406–411
- He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* 73: 168–178
- He Z, Yuan C, Zhang L, Yousef AE. 2008. Nterminal acetylation in paenibacillin, a novel lantibiotic. *FEBS Lett* 582: 2787–2792
- Hu B, Shen L, Lian X, et al. 2014. Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 111(12):4495-4500
- Huang E & Yousef AE. 2015. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol Res (Pavia)* 181:15–21
- Jain D, Pancha I, Mishra SK, Shrivastav A, Mishra S. 2012. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents. *Bioresour Technol.* 115:228–236
- Jaouadi B, Jaouadi NZ, Rejj H, Naili B, Bejj A, Dhouib A, Bejar S. 2013. Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase. *Int. J. Biol. Macromol.* 60: 165-177
- Jemil N, Ayed HB, Manresa A, Nasri M, Hmidet N. 2017. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC Microbiology.* 17:144. doi:10.1186/s12866-017-1050-2
- Jiang C, Shi J, Liu Y, Zhu C. 2014. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control* 35(1):41–48
- Jungblut AD, Wood SA, Hawes I, Webster-Brown J, Harris C. 2012. The Pyramid Trough Wetland: environmental and biological diversity in a newly created

- Antarctic protected area, *FEMS Microbiology Ecology*. 2012. 82: 2. 356–366
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Res. Int.* Article ID 827965
- Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, Jaoua SP. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 881-888
- Kang SM, Radhakrishnan R, Lee IJ. 2015b. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1517–1527
- Kaur G, Singh T, Malik R, Bhardwaj A, De S. 2014. Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against *L. monocytogenes*, *E. faecium*, and *E. faecalis* and bacteriocin cross resistance and antibiotic susceptibility of their bacteriocin resistant variants. *J. Food Sci Technol.* 51(2): 233-244
- Kékessy DA, Piguet JD. 1970. New Method for Detecting Bacteriocin Production. *Applied Microbiology*. 20(2):282-283
- Kopcakova A, Stramova Z, Kvasnova S, Godany A, Perhacova Z, Pristas P. 2014. Need for database extension for reliable identification of bacteria from extreme environments using MALDI TOF mass spectrometry. *Chemical Papers*.. 68 (11) 1435–1442
- Kumar SN, Dileep C, Mohandas C, Nambisan B, Ca J. 2014. Cyclo (D-Tyr-DPhe): a new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *J. Pept. Sci.* 20 173–185
- Laanbroek HJ, Keijzer RM, Verhoeven JTA, Whigham DF. 2012. The distribution of ammonia-oxidizing betaproteobacteria in stands of Black Mangroves (*Avicennia germinans*). *Front. Microbiol.* 3:153
- Lakowitz A, Godard T, Biedendieck R, Krull R. 2018. Mini review: Recombinant production of tailored bio-pharmaceuticals in different *Bacillus* strains and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 126: 27–39
- Lamers LPM, Van Diggelen JMH, Op Den Camp HJM, Visser EJW, Lucassen ECHET, Vile MA, et al. 2012. Microbial transformations of nitrogen, sulfur, and iron dictate vegetation composition in wetlands: a review. *Front. Microbiol.* 3:156
- Lee GH, Rhee MS, Chang DH, Kwon KK, Bae KS, Yang SH, Kim BC. 2014. *Bacillus solimangrovi* sp. nov., isolated from mangrove soil. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology. 64, 1622–162

- Lee SG & Chang HC. 2018. Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7. LWT - Food Science and Technology. 87: 8 – 15
- Li Y, Wu C, Zhou M, Wang ET, Zhang Z, Liu W, Ning J, Xie Z. 2017. Diversity of Cultivable Protease-Producing Bacteria in Laizhou Bay Sediments, Bohai Sea, China. Frontiers in Microbiology. 8:405
- Ligi T, Oopkaup K, Truu M, Preem J-K, Nolvak H, Mitsch WJ, Mander U, Truu J. 2014. Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. Ecol. Eng. 72: 56–66
- Lim KB, Balolong MP, Kim SH, Oh JK, Lee JY and Kang D-K. 2016. Isolation and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. BioMed Research International. Article ID 8521476
- Lisboa MP, Bonatto D, Bizani D, Henriques JA, Brandelli A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. Int Microbiol. 9(2):111-8
- Liu M, Cui Y, Chen Y, Lin X, Huang H, Bao S. 2017. Diversity of *Bacillus*-like bacterial community in the sediments of the Bamenwan mangrove wetland in Hainan, China. Canadian Journal of Microbiology. 63. N. 3. 238 – 245
- Liu X, Lee JY, Jeong S-J, Cho KM, Kim GM, Shin J-H, Kim J-S, Kim JH. 2015. Properties of a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* EMD4 Isolated from Ganjang (Soy Sauce). J. Microbiol. Biotechnol. 25(9) 1493–1501
- Lohans CT, Huang Z, van Belkum MJ, Giroud M, Sit CS, Steels EM, Zheng J, Whittall RM. 2012. Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicidin A via a partial desulfurization/ reduction strategy. J Am Chem Soc 134: 19540–19543
- Lovecka P, Pacovska I, Stursa P, Vrchotova B, Kochankova L, Demnerova K. 2015. Organochlorinated pesticide degrading microorganisms isolated from contaminated soil. New Biotechnology. 32 (1)
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275
- Mahlapuu M, Hakansson J, Ringstad L, Bjorn C. 2016. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. Front Cell Infect Microbiol 6:194
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 58:

- Mayr-Harting A, Hedjes AJ, Berkeley CW. 1972. Methods for studying bacteriocins. In: Norris JB, Ribbons D (eds) *Methods in microbiology*, 7: 315–412
- Menasria T, Aguilera M, Hocine H, Benammar L, Ayachi A, Bachir AS, Dekak A, Monteoliva-Sánchez M. 2018. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research* 207: 289–298
- Miles AA, Misra SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*. 38(6):732-749
- Minnard J & Alippi AM. 2016. Partial characterization of bacteriocin-like compounds from two strains of *Bacillus cereus* with biological activity against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease. *Lett Appl Microbiol*. 63(6):442-449
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Áreas Úmidas - Convenção de Ramsar**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zonas-umidas-convencao-de-ramsar>. Acesso em 23 jul. 2018
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Acesso em 27 jun. 2018
- Mohkam M, Nezafat N, Berenjian A, Ali Mobasher M, Ghasemi. 2016. Identification of *Bacillus* Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, recA, rpoB Gene Sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics & Antimicro. Prot* 8:8–18
- Mokoena MP. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*. 26: 22(8)
- Montanhini MTM, Bersot LS. 2013. Evaluation of psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from refrigerated dairy products. *Acta Scientiarum Technology*. 35(1):163-167
- Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. 2015. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLoS ONE*. 10(5): e0127738
- Motta AS & Brandelli A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*. 92:63-71
- Motta AS, Cannavan FS, Tsai S-M, Brandelli A. 2007. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch Microbiol*. 188:367–375
- Nakamura K, Arakawa K, Kaway Y, Yasuta N, Chujo M, Watanabe W, Iloka H,

- Tanioka M, Nishimura J, Kitazawa H, Tsurumi K, Saito T. 2013. Food preservative potential of gassericin A- containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39. *Anim Sci J.* 84: 144-149
- Nielsen P, Fritze D, Priest FG. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 141:1745–176
- Oliveira SS, Abrantes J, Cardoso M, Sordelli D, Bastos MCF. 1998. Staphylococcal strains involved in mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. *Lett Appl Microbiol.* 27:287-291
- Omrane BM, Moujehed E, Bem Elhoul M, Zarai-Jaouadi N, Mechri S, Rekik H, Kourdali S, El Hattab M, Badis A, Sayadi S, Bejar S, Jaouadi B. 2016. A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101 *Int. J. Biol. Macromol.*, 91: 961-972
- Ozcan T & Kurdal E. 2012. The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. *Int J Dairy Technol.* 65: 585–593
- Pal M, Mulu S, Tekle M, Pintoo SV, Prajapati J. 2016. Bacterial Contamination of Dairy Products. *Beverage and Food World.* 43:40- 43
- Pandey H, Kumar V, Roy BK. 2014. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* as a test plant. *Toxicol Rep.* 1:300-308
- Panosyan H, Hakobyan A, Birkeland NK, Trchounian A. 2018. Bacilli community of saline–alkaline soils from the Ararat Plain (Armenia) assessed by molecular and culture-based methods. *Systematic and Applied Microbiology* 41: 232–240
- Park JE, Kim HR, Park SY, Choi SK, Park SH. 2017. Identification of the biosynthesis gene cluster for the novel lantibiotic paenilan from *Paenibacillus polymyxa* E681 and characterization of its product. *J Appl Microbiol.* Nov;123(5):1133-1147
- Peralta RM, Ahn C, Gillevet PM. 2013. Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands. *Sci Total Environ* 443: 725–732
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* 13:S3. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S3
- Piper C, Casey PG, Hill C, Cotter PD, Ross RP. 2012. The lantibiotic lactacin 3147 prevents systemic spread of *Staphylococcus aureus* in a murine infection model. *Int J Microbiol.* 2012:806230
- Rahmer R, Heravi KM, Altenbuchner J. 2015. Construction of a super-competent *Bacillus subtilis* 168 using the PmtIA-comKS inducible cassette. *Front Microbiol.* 6:1431

- Ramu R, Shirahatti OS, Devi AT, Prasad A. 2015. Bacteriocins and their applications in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* DOI: 10.1080/10408398.2015.1020918
- Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS microbiology reviews* 29: 303–29
- Rehman R, Ahmed M, Siddique A, Hasan F, Hameed A, Jamal A. 2017. Catalytic role of thermostable metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as dehairing and destaining agent. *Appl Biochem Biotechnol.* 181:434–450
- Renwick MJ, Brogan DM, Mossialos E. 2016. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *J. Antibiot (Tokyo)* 69: 73-88
- Ribeiro SC, O'Connor PM, Ross RP, Stanton C, Silva CC. 2016. An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *Int. Dairy J.* 63: 18–28
- Romano A, Vitullo D, Di Pietro A, Lima G, Lanzotti V. 2011. Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7, *J. Nat. Prod.* 74:145–151
- Salazar F, Ortiz A, Sansinenea E. 2017. Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 11: 177-182
- Saraoui T, Fall PA, Leroi F, Antignac J-P, Chéreau S, Pilet MF. 2016. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food microbil.* 53, Part A:70-78
- Sarika A, Lipton A, Aishwarya M, Dhivya R. 2012. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* and application of its bacteriocin to manage spoilage bacteria in high-value marine fish under different storage temperatures. *Appl. Biochem Biotechnol.* 167:1280-1290
- Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. 2017. Can Maldi-tof mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends in Microbiology.* 25(6): 447-455
- Scopes RK. 1994. **Protein Purification.** 422 p.
- Senbagam D, gurusamy R, Senthilkumar B. 2013. Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 934-941
- Serkebaeva YM, Kim Y, Liesack W, Dedysh SN. 2013. Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions. *PLoS One* 8: e63994

- Settanni L & Corsetti A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 123–138
- Sewalt V, Shanahan D, Gregg L, La Marta J, Carrillo R. 2016. The Generally Recognized as Safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Indus Biotechnol.* 12: 295–302
- Shi B, Zheng H, Huang J, Luo X, Luo X. 2015. Purification and partial characterization of a thermostable antimicrobial protein from *Bacillus subtilis* FB123. *World J. Microbiol Biotechnol.* 31: 1285-1290
- Smaoui S, Elleuch L, Bejar W, Karray-Rebai I, Ayadi I, Jaouadi B, Mathieu F, Chouayekh H, Bejar S, Mellouili L. 2010. Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Appl Biochem Biotechnol.* 162:1132–1146
- Sosunov V, Mischenko V, Eruslanov B, Svetoch E, Shakina Y, Stern N, Majorov K, Sorokoumova G, Selishcheva A, Apt A. 2007. Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. *J Antimicrob Chemother.* 59:919–25
- Starostin KV, Demidov EA, Bryanskaya AV, Efimov VM, Rozanov AS, Peltek SE. 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports.* 5:16989
- Steiner I, Errhalt P, Kubesch K, Hubner M, Holy M, Bauer M, Müllet M, Hinterberger S, Widmann R, Mascher D, Freissmuth M, Kneussl M. 2008. Pulmonary pharmacokinetics and safety of nebulized duramycin in healthy male volunteers. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 378:323–33
- Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahm YT. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol* 61(2):93–103
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. 1995. **Análise do Solo, Plantas e Outros Materiais.** 2 ed rev. e ampl. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS. 174 p.
- Thatoi H, Behera BC, Mishra RR, Dutta SK. 2013. Biodiversity and biotechnological potential of microorgan- isms from mangrove ecosystems: a review. *Ann Microbiol.* 63: 1–19
- Timperio AM, Gorrasi S, Zolla L, Fenice M. 2017. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *Jacobs JM, ed. PLoS ONE.* 12(7):e0181860
- Todorov SD, Franco BD, Wiid IJ. 2014. In vitro study of beneficial properties and safety of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products. *Benef. Microbes.* 24: 1–16

- Torres AJ, Petroselli G, Daz M, Erra-Balsells R, Audisio MC. 2015. *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against Gram-positive foodborne pathogenic bacteria: UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds. *World J. Microbiol Biotechnol.* 31: 929-940
- Ünlü G, Nielsen B, Ionita C. 2015. Production of Antilisterial Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Dairy-Based Media: A Comparative Study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 7 (4): 259 – 274
- Wang HL, Zhang J, Sun L. 2018. *Fictibacillus iocasae* sp. nov., isolated from the deep-sea sediment in Pacmanus, Manus Basin. *Archives of Microbiology* <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1527-x>
- Xiaofei LV, Junbao Yu, Yuqin Fu, Bin M, Fanzhu Qu, Kaj N, Huifeng W. 2014. A Meta-Analysis of the Bacterial and Archaeal Diversity Observed in Wetland Soils. *The Scientific World Journal.* 437684
- Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Exp.* 2, 48. doi: 10.1186/2191-0855-2-48
- Ye, R, XU C, Wan S, Peng L, Wang H, Xu ZP, Aguilar Y, Xiong Z, Zeng HW. 2013. Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine. *Biochem Biophys Res. Commun* 439: 148-153
- Zarai JN, Rekik H, Bem-Elhoul M, Zohra-Rahem F, Hila CG, Bem-Aicha HS, Badis A, Toumi A, Bejar S, Jaouadi B. 2015. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *Int J Biol Macromol.* 79:952–964
- Zhang S, Liao SA, Yu X, Lu H, Xian JA, Guo H, Wang A, Xie J. 2015. Microbial diversity of mangrove sediment in Shenzhen Bay and gene cloning, characterization of an isolated phytase-producing strain of SPC09 *B. cereus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(12):5339-50
- Zhang J, Jiao S, Lu Y. 2018. Biogeographic distribution of bacterial, archaeal and methanogenic communities and their associations with methanogenic capacity in Chinese wetlands. *Science of the Total Environment* 622–623. 664–675
- Zhang Q & Liu W. 2013. Biosynthesis of thiopeptide antibiotics and their pathway engineering. *Nat Prod Rep.* 30: 218-226
- Zhao P, Quan C, Jin L, Wang L, Wang J, Fan S. 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 401–409
- Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M. 2017.

Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*.
Biotechnol. 101(15):5951-5960

Appl

Microbiol

Zhao P, Xue Y, Gao W, Li J, Zu X, FU D, Bai X, Zuo Y, Hu Z, Zhang F. 2018. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides* 101 (2018) 10–16

Zorzi A, Deyle K, Heinis C. 2017. Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*. 38:24–29

9. ANEXOS

9.1 Artigo

Isolamento, identificação e atividade biológica de bactérias isoladas de sedimento de áreas úmidas de uma Unidade de Conservação na Região Sul do Brasil

Resumo

As áreas úmidas são ecossistemas ricos em biodiversidade, e sua importância ecológica é reconhecida em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi pesquisar isolados bacterianos a partir de amostras de sedimento da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo/RS e estudar substâncias com atividade biológicas por elas produzidas. As linhagens bacterianas foram identificadas através do Maldi-tof, testadas quanto à produção de enzimas hidrolíticas e de substâncias com atividade antimicrobiana. Para avaliação das propriedades enzimáticas, dos 37 isolados selecionados (100%), 64% apresentaram resultado positivo para o teste da amilase, 16% para gelatinase, 37% para lipase e 91% para protease. Diante desses resultados, 6 isolados bacterianos foram selecionados para o teste da sobrecamada, observando-se a presença de halos de inibição em apenas um isolado *Bacillus* sp. sed 2.2 contra a indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Este isolado foi selecionado e a substância antimicrobiana por ele produzida foi parcialmente purificada através da precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida de gel filtração Sephadex G-100. Esta substância foi ativa contra algumas espécies de *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Em conclusão, os isolados obtidos de amostras de sedimento são fontes importantes de compostos bioativos, incluindo enzimas e peptídeos antimicrobianos, que podem apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas importantes.

Palavras-chave: Áreas úmidas, *Bacillus*, propriedades bioativas, purificação de peptídeos

1. Introdução

As áreas úmidas são ecossistemas importantes, com altas concentrações energéticas e distribuídas em praticamente todas as regiões ao longo do mundo (Jungblut et al., 2012). Os micro-organismos ali presentes desempenham papéis ecológicos importantes e que são fundamentais para as funções desses ambientes (Hu et al., 2014). A técnica de pirosequenciamento do gene 16S rRNA foi utilizada por Ansola et al., (2014), a fim de caracterizar a composição da comunidade bacteriana do solo de uma área úmida e os principais grupos microbianos encontrados foram: Proteobacteria, Verrucomicrobia e Chloroflexi. A importância de se estudar esses ambientes vai muito além de apenas conhecer a comunidade microbiana, pois muito desses micro-organismos são produtores de compostos com diferentes atividades biológicas. Li et al., (2017) investigaram a diversidade de bactérias produtoras de proteases extracelulares, de sedimentos na China, e dos 121 isolados estudados, identificaram bactérias pertencentes aos gêneros: *Pseudoalteromonas* (40,5%), *Bacillus* (36,3%) e *Photobacterium* (5,8%). Ghani et al., (2013) isolaram diferentes cepas de *Bacillus licheniformes* para a produção de enzimas extracelulares comercialmente importantes, e observaram o potencial para produção de alfa-amilase, protease, pectinase e celulase. Também, os micro-organismos habitantes do solo produzem muitos produtos naturais biologicamente ativos, incluindo antibióticos importantes (Kumar et al., 2014). Algumas espécies do gênero *Bacillus* são produtoras de metabólitos secundários, incluindo antifúngicos, promotores do crescimento vegetal, sideróforos e bacteriocinas (Mora et al., 2015, Leite et al., 2016, Sansinenea et al., 2016). Na pesquisa de Salazar et al., (2017) foram caracterizados dois compostos com potencial antifúngico e antibacteriano produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* ELI 149, evidenciando um amplo espectro destes compostos. Também, Mora et al., (2015), isolaram várias espécies de *Bacillus* sp. com

atividade antimicrobiana, mostrando um excelente potencial frente aos fitopatógenos testados. Estes trabalhos mostram que muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo caracterizar novos compostos com atividade antimicrobiana, pois eles oferecem novas alternativas de investigações por moléculas que tenham potencial para as mais diversas aplicações como o controle biológico; seja para a área ambiental, biopreservação de alimentos até o emprego como biofármacos (Duarte et al., 2013, Shashidar et al., 2017).

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo estudar isolados bacterianos de sedimentos de áreas úmidas, quanto à produção de enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos, visto que não há informações na literatura que tenham explorado o potencial bioativo de bactérias da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo.

2. Materiais e métodos

2.1 Área de estudo e coleta de amostras do sedimento

As coletas de sedimento foram realizadas em uma área úmida da Unidade de Conservação do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS, nos meses de janeiro, abril e maio de 2017. A área foi dividida em quatro quadrantes de onde foram coletadas quatro amostras de sedimento (coordenadas geográficas: Ponto 1: S 29°45'374"/ W 51°07'992, Ponto 2 S 29°45'365"/ W 51°07'982", Ponto 3 S 29°45'22.604"/ W 51°07'59.069", Ponto 4 S 29°45'22.344"/ W 51°07'58.920"). Foram coletadas 500g para as análise físico-química e 100 g para contagem de bactérias heterotróficas, à profundidade de 40 cm da superfície, com o auxílio de um equipamento tipo draga. As amostras foram transferidas para frascos estéreis e conduzidas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.2 Área de estudo e coleta de amostras do sedimento

Foram pesadas 25 g de cada amostra de sedimento, as quais foram transferidas para frascos de Erlenmeyers, contendo 225 mL de solução salina 0,85% correspondendo à diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição foram feitas as diluições decimais em triplicata até a diluição 10^{-8} . A seguir as amostras foram inoculadas em Ágar Padrão para Contagem, utilizando a técnica de espalhamento em superfície e as placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Para a contagem foram utilizadas as placas que apresentaram um número de colônias entre 25 e 250 e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia/grama (ufc/g) de sedimento. Após a contagem das bactérias heterotróficas, colônias bacterianas que apresentaram morfologias diferentes foram selecionadas e semeadas em ágar triptose de soja, e incubadas novamente a 37°C por 24 horas, para avaliação da pureza dos isolados, das propriedades morfotintoriais e posterior identificação.

2.3 Identificação dos isolados bacterianos por *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight* (Maldi-Tof/MS)

A partir do crescimento em ágar triptose de soja, uma colônia de cada isolado foi inoculada em microtubos, com 300 μ L de água Milli-Q e 900 μ L de etanol absoluto. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a velocidade de ≥ 13.000 rpm, durante 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente. Na sequência foi adicionado ácido fórmico 70% (30 μ L) ao sedimento e acetonitrila (30 μ L) seguidos de homogeneização em vórtex e nova etapa de centrifugação, formando-se um pellet. Logo após, foi pipetado 1 μ L de sobrenadante sobre uma placa de aço inoxidável e deixado secar a temperatura ambiente. Subsequentemente foi adicionado 1 μ L de matriz constituída de solução de ácido α ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics, 2015). As análises foram realizadas em um aparelho MALDI Biotyper 4.0, software MBT OC, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.4 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias selecionadas

Para a prova da amilase os isolados bacterianos foram semeados em placas contendo Ágar Nutritivo, suplementado com uma solução de amido solúvel 0,2%. As culturas foram incubadas na temperatura de 37°C por 48 horas e como controle positivo inoculou-se a cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 (Hankin; Anagnost Akis, 1975). Para avaliar a atividade proteolítica os isolados bacterianos foram semeados em placas contendo Ágar leite desnatado 10% e incubados nas mesmas condições. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi inoculada como controle positivo (Frazier & Rupp, 1928; Montanhini & Bersot, 2013). Para verificar a produção de gelatinase os isolados bacterianos foram semeados em tubos contendo caldo nutritivo, acrescido de 12% de gelatina e incubados nas condições descritas acima. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo (Kurtzman & Fell, 1998). Para avaliação da atividade lipolítica os isolados foram semeados em placas contendo Ágar Tributirina e incubados a 37°C por 72 horas. Para o controle positivo inoculou-se a cepa de *Candida parapsilosis* (isolado ambiental) (Montanhini & Bersot, 2013).

2.5 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelas bactérias selecionadas

O teste da sobrecamada foi empregado e os isolados foram inoculados em picada em triplicata sobre placas contendo Ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação a fim de se avaliar o antagonismo dos isolados, foi vertido uma sobrecamada de ágar triptose de soja semi-sólido 0,6%, inoculado com 1% das cepas indicadoras *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, contendo aproximadamente $1,9 \times 10^8$ UFC/mL. As placas inoculadas foram incubadas à 37°C por 24 horas e após foi verificada a presença ou não de halos de inibição, os quais foram medidos e expressos em milímetros (mm) (Kékessy & Piguet, 1970).

2.6 Análise do gene 16S rRNA para identificação do isolado bacteriano selecionado

A partir do isolado selecionado, foi realizada a extração de DNA, amplificação e sequenciamento de bases por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) no *ThermalCycler* modelo 2720 (*Applied Biosystems by Life Technologies*®). O primer para sequenciamento bacteriano 16S foi F C27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e R 530 (CCGCGGCTGCTGGCACGTA). A reação da PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*Invitrogen*®), 1,5 mM de MgCl₂ (4G®), 200 µM de dNTPs (*Ludwig Biotecnologia*®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e água miliQ estéril para completar o volume da reação. A PCR foi realizada nas condições de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final de 10 minutos a 72°C. O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (*Applied Biosystems*). Os resultados foram analisados pelo programa Chrome versão 2.6.4 (*Technelysium Pty Ltd*) e comparados ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.7 Produção da substância antimicrobiana pelo isolado selecionado

Para a produção da substância antimicrobiana, o isolado *Bacillus* sp. sed 2,2 foi cultivado em 100 mL de meio TSB a 30°C em um agitador rotativo a 50 ciclos min, durante os tempos desejados. A determinação do número de células viáveis (UFC/mL) foi realizada como descrito por Motta & Brandelli (2002). Após o cultivo por 48h, as células foram colhidas por centrifugação a 10.000g por 15 min e o sobrenadante da cultura foi submetido à precipitação com

sulfato de amônio a 60% de saturação. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. Esta solução foi ainda purificada por cromatografia de filtração em gel em uma coluna Sephadex G-100. Foram coletadas 30 frações de 1,0 mL e sua absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm, e as frações foram liofilizadas. Essas foram ressuspensas em 100 µL de fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 e após, foi determinada a atividade antimicrobiana das frações coletadas conforme Motta & Brandelli (2002). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A bactéria indicadora foi *Corynebacterium fimi* NCTC 7547.

2.8 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado

Foram preparadas suspensões de cada um dos micro-organismos indicadores, em solução salina 0,85% de acordo com a escala de turbidez de MacFarland 0,5. Cada uma das suspensões foi espalhada em placas contendo ágar Mueller-Hinton e para as espécies de *Candida* foi utilizado o meio Mueller-Hinton glicose com azul de metileno. Em seguida, foram inoculados 20 µL do sobrenadante bruto obtido através da Sephadex G-100 e incubado nas condições ótimas de crescimento de cada micro-organismo indicador (30°C ou 37°C) por 24 horas. Após período de incubação foi observada a formação de halos de inibição, os quais foram medidos e expressos em milímetros. Foram empregadas espécies dos seguintes gêneros: *Bacillus*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* e *Staphylococcus*.

3. Resultados

3.1 Pontos de coleta das amostras de sedimento

As coletas de sedimento foram realizadas em quatro pontos do banhado da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina. O ponto amostral 1 estava localizado próximo à margem do banhado e com algumas espécies arbustivas em sua volta. O segundo ponto amostral havia a

presença de plantas aquáticas e água corrente. Já o terceiro ponto amostral tinha como características a presença de plantas aquáticas densamente distribuídas, água parada e muitas espécies arbustivas ao redor. O quarto ponto apresentou poucas plantas aquáticas, troncos de árvores e foi considerado de difícil acesso.

3.2 Contagem de bactérias heterotróficas das amostras de sedimento

As coletas de sedimento para contagem das bactérias heterotróficas foram realizadas no outono, em período seco e temperatura em torno de 25°C. Os resultados obtidos a partir do cultivo em Ágar Padrão para Contagem revelaram valores entre $1,8 \times 10^4$ UFC/g a $5,8 \times 10^4$ UFC/g de sedimento, conforme a Tabela 1. As contagens de bactérias heterotróficas nos quatro pontos analisados mostraram-se homogêneas. A partir do crescimento de colônias em meio ágar triptose de soja, foram escolhidos diferentes morfotipos. Nas placas com isolados do ponto 1, foram selecionadas 9 colônias bacterianas, já no ponto 2, foram selecionadas 8 bactérias e nos pontos 3 e 4, foram obtidas 10 colônias, para cada um dos pontos, totalizando 37 isolados bacterianos. Desses 37 isolados, 9 foram caracterizados como bactérias Gram negativas e 28 bactérias Gram positivas.

3.3 Identificação preliminar dos isolados bacterianos por Matrix Associated Laser Desorption-Ionization- Time of Flight (Maldi-Tof/MS)

Em relação à análise por *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization Time of Flight* (Maldi-Tof/MS), onde o score entre 0.000 - 1.699 indica uma identificação não confiável, o score entre 1.700 - 1.999 como identificação provável do gênero, 2.000 - 2.299, como identificação segura em nível de gênero e 2.300 - 3.000 indica uma segura identificação em nível de espécie, algumas identificações foram realizadas. Das 37 colônias bacterianas selecionadas, foi possível a identificação de 13 isolados com segura identificação em nível de gênero e 6 isolados bacterianos foram identificados com provável identificação em nível de gênero, conforme a tabela 2. Não foi

possível a identificação segura de nenhum isolado em nível de espécie e 18 isolados bacterianos não foram identificados pelo Maldi-Tof.

3.4 Produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias selecionadas

Na avaliação da produção de diferentes enzimas extracelulares observou-se que de 37 (100%) isolados testados, 24 (64,86%) degradaram o amido. A atividade proteolítica foi verificada em 34 isolados, correspondendo a 91,89%. Dos micro-organismos isolados apenas 6 foram capazes de degradar a gelatina, correspondendo à 16,21%. A produção de lipase foi observada em 14 isolados (37,83%), conforme a Figura 1. Dos 37 isolados bacterianos, apenas 2 (5,40%) foram produtores das 4 enzimas testadas e 9 (24,32%) isolados se mostraram positivos em pelo menos 3 enzimas testadas. Desses 37 isolados 6 (16,21%) apresentaram um melhor perfil enzimático apresentando maior média de halo em pelo menos dois testes. São eles: *Bacillus megaterium* sed 1.5, isolado sed 2.2, *Bacillus megaterium* sed 2.8, *Bacillus* sp. sed 3.5, isolado sed 3.11 e o isolado sed 4.3.

3.5 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelo teste da sobrecamada

A partir dos resultados da atividade enzimática, os 6 isolados que apresentaram melhor perfil enzimático, foram testados quanto a produção de atividade antimicrobiana através do método da sobrecamada. Esse teste revelou a presença de halos de inibição em apenas um isolado sed 2.2, apresentando valor de 12 mm, em média, frente à cultura indicadora de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. A partir desse resultado, o isolado sed 2.2, foi selecionado para as próximas etapas do trabalho. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 não foi inibida por nenhum dos isolados, nas condições experimentais testadas.

3.6 Análise do gene 16S rRNA para identificação do isolado bacteriano selecionado

A partir dos resultados da produção das enzimas hidrolíticas, selecionou-se o isolado sed 2.2 como sendo a bactéria com melhor desempenho. Após a realização da identificação pela análise do gene 16S rRNA a bactéria foi identificada em nível de gênero apresentando 99% de identidade com bactérias do gênero *Bacillus*, sendo identificado como *Bacillus* sp. sed 2.2. Sua sequência foi depositada pelo código MH666075 no Standard Nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.7 Avaliação da produção de atividade antimicrobiana pelo *Bacillus* sp. sed 2.2

Bacillus sp. sed 2.2 foi incubado em condições aeróbias por 57 horas a 30°C. A atividade antimicrobiana do *Bacillus* sp. sed 2.2, foi inicialmente detectada na fase de crescimento exponencial e a atividade máxima foi observada do início ao final da fase estacionária, tendo um maior intervalo de produção da atividade antimicrobiana entre 33 e 48 horas (Figura 2), com 100 UA/mL. O pH manteve-se em 7,0 durante todo o cultivo. A substância antimicrobiana obtida em aproximadamente 24 horas de cultivo foi purificada por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. Foram coletadas 30 alíquotas de 1,0 mL e sua absorbância foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro, após foi verificada a atividade antimicrobiana contra a cepa indicadora *Corynebacterium fimi* NCTC 7547. Na figura 3 foi possível observar as alíquotas coletadas, a absorbância a 280 nm e a atividade antimicrobiana das frações que apresentaram atividade antimicrobiana.

3.8 Determinação do espectro de ação do sobrenadante bruto parcialmente purificado

As frações coletadas após a purificação parcial e que apresentaram atividade antimicrobiana, foram agrupadas e empregadas para a determinação do espectro de ação, frente a diversos micro-organismos, incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras. O

resultado da medição dos halos de inibição está demonstrado na tabela 3. Foi verificada atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas e patogênicas como algumas espécies de *Listeria*. Porém observou-se que outras espécies microbianas não foram inibidas, como *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria innocua* ATCC 1572, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35954, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 35591, *Listeria monocytogenes* 4B carcaça (Alimento), *Listeria innocua* 6B (Alimento), *Listeria monocytogenes* 17D78/03 (Alimento), *Listeria monocytogenes* 4C (Alimento), *Listeria innocua* L 07 (Leite de búfala), *Listeria innocua* L 10 (Leite de búfala), *Listeria innocua* L 11 (Leite de búfala), *Listeria innocua* L 13 (Leite de búfala), *Listeria monocytogenes* QF Oxford – 6 (Queijo fatiado), *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258.

4. Discussão

As áreas úmidas são ecossistemas ricos em biodiversidade, e sua importância ecológica é reconhecida em todo o mundo (Junk, 2013, Richardson et al., 2015). Alguns estudos já demonstraram que fatores como matéria orgânica, nitrogênio total, nitrogênio inorgânico, demanda química de oxigênio (DQO) e pH são fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana do solo (Ansola et al., 2014, Ligi et al., 2014, Arroyo et al., 2015, Ding et al., 2015). Nesse trabalho foram isolados 37 micro-organismos, dos quais 19 isolados foram identificados em nível de gênero, através do Maldi-Tof/MS. A espectrometria de massas é uma ferramenta importante, precisa e rápida para identificação de isolados bacterianos na área clínica. Contudo, sua aplicação em um contexto ecológico, considerando as bactérias de origem ambiental, ainda é

limitada (Hausdorf et al., 2013). Entretanto alguns pesquisadores vêm empregando esta ferramenta para identificação de bactérias ambientais. Das 45 bactérias isoladas de um ambiente marinho, Timperio et al., (2017), identificaram 16 bactérias em nível de espécie e 23 com identificação segura em nível de gênero. Lovecka et al., (2015), isolaram bactérias de solo contaminado, dos 7 isolados bacterianos, 3 tiveram sua classificação como segura em nível de gênero. Kopcakova et al., (2014), buscaram identificar bactérias isoladas de resíduos industriais, dos 29 isolados bacterianos, 27,58% tiveram identificação segura para gênero e 31% como provável identificação de gênero. Devido a essa dificuldade de identificação, principalmente ao que se refere ao gênero *Bacillus*, outras ferramentas vêm sendo empregadas na identificação de bactérias. Além do mais, o gênero *Bacillus*, frequentemente isolado de amostras de solo, contém vários grupos de espécies estreitamente relacionadas, cuja identificação é difícil (Starostin et al., 2015). Um exemplo são as espécies de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*, que possuem sequências do gene 16S rRNA altamente semelhantes, o que torna difícil a identificação com base nesta análise. Para superar esta desvantagem, outros genes como *recA*, *rpoB*, *gyrB*, vêm sendo estudados, como um método alternativo para a diferenciação de espécies de *Bacillus* (Mohkam et al., 2016).

As bactérias isoladas neste trabalho tiveram suas propriedades bioativas estudadas, demonstrando um potencial na produção de compostos com atividade enzimática e antimicrobiana. A seleção do isolado *Bacillus* sp, sed 2.2, a partir do Ponto 2 de coleta, deu-se por ter sido o microrganismo com melhor desempenho nas propriedades avaliadas. O trabalho de Correia et al., (2014), que avaliou o potencial enzimático de bactérias provenientes de sedimento de um manguezal, constataram que aproximadamente 60% dos seus isolados apresentaram atividade amilolítica e 26% atividade lipolítica, resultados bem próximos encontrados nesse estudo, onde 64% dos isolados apresentaram atividade amilolítica e 37% com atividade lipolítica. Arumugam et al., (2017) descreveram a importância de se pesquisar bactérias de áreas úmidas para serem usadas industrialmente e a grande maioria das bactérias estudadas foi produtora de amilase, lipase, celulase

e protease. Das 46 bactérias isoladas de áreas úmidas, 41% apresentaram atividade lipolítica, 30% celulolítica, 19% amilolítica e 8 % proteolítica (Bibi et al., 2017).

As bactérias ambientais também vêm sendo pesquisadas como fontes de novas substâncias com atividade antimicrobiana tendo em vista os problemas de resistência bacteriana a múltiplos fármacos (Ventola, 2015; Brown & Wright 2016). A atividade antimicrobiana produzida pelo *Bacillus* sp. sed 2.2 foi inicialmente observada na fase de crescimento exponencial, tendo-se a atividade máxima do início ao final da fase estacionária (entre 33 e 48 horas) com 100 UA/ml. No trabalho de Liu et al., (2015) a atividade antimicrobiana estudada mostrou-se maior entre 36 e 60 horas, com 320 UA/mL. Já no trabalho de Embaby et al., (2014), o início da produção da substância antimicrobiana foi registrado na fase exponencial e aumentou durante a fase estacionária de crescimento, atingindo seu pico máximo com 62 horas de cultivo. Estes dados demonstram que todas estas substâncias produzidas apresentam cinética de metabólito secundário.

A substância antimicrobiana estudada foi parcialmente purificada com uma combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida de gel filtração. Com os resultados obtidos observa-se que a atividade antimicrobiana foi precipitada com uma concentração de sulfato de amônio de 0-60%, resultados estes que vão ao encontro dos encontrados outros autores (Alanazi et al., 2016, Lim et al., 2016). Os resultados da cromatografia de gel filtração indicam também que a substância produzida pelo *Bacillus* sp. sed 2.2, eluiu no volume morto da coluna Sephadex G-100, podendo estar formando agregados de massas moleculares altas (> 150 kDa). Shi et al., (2015) utilizaram a precipitação com sulfato de amônio e a diálise para purificação parcial da substância. Essa substância estudada exibiu um amplo espectro de ação, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e alguns patógenos ambientais. Boottanum et al., (2017) trabalharam com uma substância parcialmente purificada. Os protocolos adotados foram os mesmos mencionados acima, posteriormente a atividade antimicrobiana foi avaliada contra a cepa *Burkholderia pseudomallei* e outras bactérias patogênicas. Neste trabalho a substância antimicrobiana foi testada contra bactérias

Gram positivas, Gram negativas e leveduras. A substância inibiu o crescimento de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 e alguns isolados de *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. No entanto, essa substância não foi capaz de inibir bactérias Gram negativas e leveduras, demonstrando um espectro de ação mais restrito. No trabalho de Lee & Chang, (2018) a substância antimicrobiana estudada foi testada contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas como *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. Os resultados encontrados por Alnaimat et al., (2017), mostraram que a substância antimicrobiana foi ativa contra todas as cepas indicadoras testadas, sugerindo um espectro de ação mais amplo. Em conclusão, os isolados obtidos de amostras de sedimento são fontes importantes de compostos bioativos, incluindo substâncias com potencial antimicrobiano e enzimático. Estudar as propriedades e a aplicabilidade destes compostos abre uma janela de estudo importante considerando a prospecção de novas moléculas com atividade biológica de interesse, bem como entender a funcionalidade destes isolados a partir do ambiente amostrado.

5. Referências

- Ansola G, Arroyo P, Miera LES (2014) Characterisation of the soil bacterial community structure and composition of natural and constructed wetlands. *Science of the Total Environment*. 473–474: 63-71
- Arroyo P, Saenz De Miera LE, Ansola G (2015) Influence of environmental variables on the structure and composition of soil bacterial communities in natural and constructed wetlands. *Sci. Total Environ*. 506: 380–390
- Alanazi AS, Qureshi KA, Elhassan GO, EL-Agamy EI (2016) Isolation, Purification and Characterization of Antimicrobial Agent Antagonistic to *Escherichia coli* ATCC 10536 Produced by *Bacillus pumilus* SAFR-032 Isolated from the Soil of Unaizah, Al Qassim Province of Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 19 (5): 191-201
- Alnaimat S, Aladaileh S, Shattal SA, Al-asoufi A, Nassarat H, Abu-Zaitoon Y (2017) Isolation and Molecular Characterization of a Newly Isolated Strain of *Bacillus* sp. HMB8, With a Distinct Antagonistic Potential Against *Listeria monocytogenes* and Some Other Food Spoilage Pathogens. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 10(2): 135 – 143
- Arumugam T, Kumar PS, Kameshwar R, Prapanchana K (2017) Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. *Microbial Pathogenesis*. 107: 225 – 233
- Bibi F, Ullah I, Alvi SA, Bakhsh SA, Yasir M, Al-Ghamdi AAK, Azhar EI (2017) Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*. 16 (2): doi:10.4238/gmr16029657
- Boottanun P, Potisap C, Hurdle JG, Sermswan RW (2017) Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*. 7:16. <http://doi.org/10.1186/s13568-016-0302-0>
- Brown ED, Wright GD. (2016) Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 529: 336–343
- Correia JLA, Dos Santos TR, Da Silva AA, Marques OM (2014) Isolation, identification and evaluation of the enzymatic potential of autochthonous bacteria from mangrove sediments of. Available at: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1127-20849-180947.pdf> Accessed on 15 jun. 2018
- Ding X, Peng XJ, Jin BS, Xiao M, Chen JK, Li B, et al (2015) Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in a beach wetland of the largest freshwater lake in China. *Front. Microbio*. 6:129
- Duarte AFdS, Ceotto H, Coelho MLV, Brito MAVdP, Bastos MdCdF (2013) Identification of new staphylococcins with potential application as food biopreservatives. *Food Control*. 32: 313-321

Embaby AM, Heshmat Y, Hussein A, Marey HS (2014) A Sequential Statistical Approach towards an Optimized Production of a Broad Spectrum Bacteriocin Substance from a Soil Bacterium *Bacillus* sp. YAS 1 Strain. *The Scientific World Journal*. 2014:396304

Frazier WC, Rupp P (1928) Studies on the proteolytic bacteria of milk: a medium for the direct isolation of caseolytic milk bacteria. *Journal of Bacteriology*.16: 57-63

Ghani M, Ansari A, Aman A, Zohra R.Ra, Siddiqui N.N, Ul Qader S.A. (2013) Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26:4- 691-697

Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycological Society of America*. 67:3- 597-607

Hausdorf L, Mundt K, Winzer M, Cordes C, Fröhling A, Schlüter O, Klocke M (2013) Characterization of the cultivable microbial community in a spinach processing plant using MALDI-TOF MS. *Food Microbiol*. 34 (2): 406–411

Hu BI, Shen L, Lian X, Zhu Q, Liu S, Huang Q, He Zf, Geng S, Cheng D-G, Lou L-P, Xu X-Y, Zheng P, He Y-F (2014) Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(12):4495-4500

Jungblut AD, Wood SA, Hawes I, Webster-Brown J, Harris C (2012) The Pyramid Trough Wetland: environmental and biological diversity in a newly created Antarctic protected area, *FEMS Microbiology Ecology*. 82: (2) 356–366

Junk WJ (2013) Current state of knowledge regarding South America wetlands and their future under global climate change. *Aquatic Sciences*. 75: 113–131

Kékessy DA, Piguet JD (1970) New Method for Detecting Bacteriocin Production. *Applied Microbiology*. 20(2): 282-283

Kopcakova A, Stramova Z, Kvasnova S, Godany A, Perhacova Z, Pristas P (2014) Need for database extension for reliable identification of bacteria from extreme environments using MALDI TOF mass spectrometry. *Chemical Papers*. 68 (11) 1435–1442

Kumar PS, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S (2014) Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*.30: 435-446

Kurtzman CP, Fell JW. (1998) *The yeasts - a taxonomic study*. Fourth revised and Enlarged edition

Lee SG, Chang HC (2018) Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7. *LWT - Food Science and Technology*. 87: 8 – 15

Leite AJ, Tulini LF, Teixeira BR, Rabinovitch L, Quintanilha JC, Gonsales RN, Cabral H, De Martins CP (2016) Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for

inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp. Food Sci Technol. 72: 261-266

Li Y, Wu C, Zhou M, Wang ET, Zhang Z, Liu W, Ning J, Xie Z (2017) Diversity of Cultivable Protease-Producing Bacteria in Laizhou Bay Sediments, Bohai Sea, China. Frontiers in Microbiology. 8:405

Ligi T, Oopkaup K, Truua M, Preema JK, Nölvaka H, Mitsch WJ, Mander Ü, Truua J (2014) Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. Ecol. Eng. 72: 56–66

Lim KB, Balolong MP, Kim SH, Oh JK, Lee JY, Kang DK. (2016) Isolation and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. Bio Med Research International. Article ID 8521476. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8521476>

Liu X, Lee JY, Jeong SJ, Cho KM, Kim GM, Shin JH, Kim JS, Kim JH (2015) Properties of a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* EMD4 Isolated from Ganjang (Soy Sauce). J. Microbiol. Biotechnol. 25(9): 1493–1501

Lovecka P, Pacovska I, Stursa P, Vrchotova B, Kochankova L, Demnerova K (2015) Organochlorinated pesticide degrading microorganisms isolated from contaminated soil. New Biotechnology. 32 (1): 26 – 31

MALDI Biotyper 4.0 User Manual Revision B. Alemanha: 2015. 187p

Miles AA, Misra SS, Irwin JO (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood. The Journal of Hygiene. 38(6): 732-749

Mohkam M, Nezafat N, Berenjian A, Ali Mobasher M, Ghasemi (2016) Identification of *Bacillus* Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, recA, rpoB Gene Sequencing and RAPD-PCR. Probiotics & Antimicro. Prot. 8:8–18

Montanhini MTM, Bersot LS (2013) Evaluation of psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from refrigerated dairy products. Acta Scientiarum Technology. 35(1):163-167

Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E (2015) Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. PLoS ONE. 10(5): e0127738

Motta AS, Brandelli A (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. Journal of Applied Microbiology. 92:63-71

Richardson SJ, Clayton R, Rance BD, Broadbent H, McGlone MS, Wilmshurst JM (2015) Small wetlands are critical for safeguarding rare and threatened plant species. Applied Vegetation Science. 18: 230–241

Salazar F, Ortiz A, Sansinenea E (2017) Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 11: 177-182

Sansinenea E, Salazar F, Jiménez J, Mendoza Á, Ortiz A (2016) Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. *Tetrahedron Lett.*57:2604–2607

Shashidar A, Marc O, Delphine D, Edwin De P, Kunling C, Sarosh B, Johan M (2017) Insights into the molecular basis of biocontrol of *Brassica* pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 lipopeptides. *Annals of Botany* 120(4): 551–562

Shi B, Zheng H, Huang J, Luo X, Luo X (2015) Purification and partial characterization of a thermostable antimicrobial protein from *Bacillus subtilis* FB123. *World J Microbiol Biotechnol.* 31:1285–1290

Starostin KV, Demidov EA, Bryanskaya AV, Efimov VM, Rozanov AS, Peltek SE (2015) Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports.* 5:16989

Timperio AM, Gorrasi S, Zolla L, Fenice M (2017) Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *Jacobs JM, ed. PLoS ONE.* 12(7):e0181860

Ventola CL (2015) The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics.* 40(4): 277-283

Legenda das figuras

Fig 1 - Avaliação da produção de enzima extracelular pelos 37 (100%) isolados bacterianos encontrados nas amostras de sedimento.

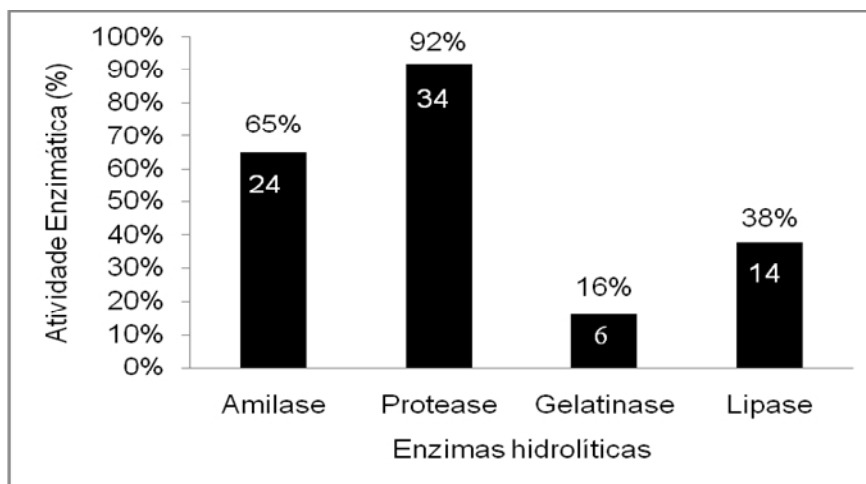


Fig 2 - Curva de crescimento e atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. sed 2.2. Densidade óptica (♦) juntamente com desvio padrão (I) e atividade antimicrobiana (■) foram avaliados. A incubação ocorreu a 30°C por até 57 horas de cultivo.

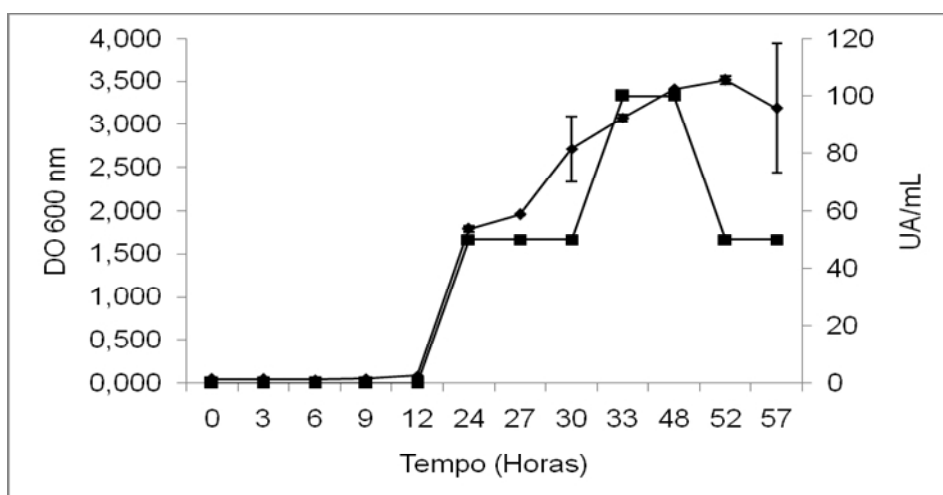
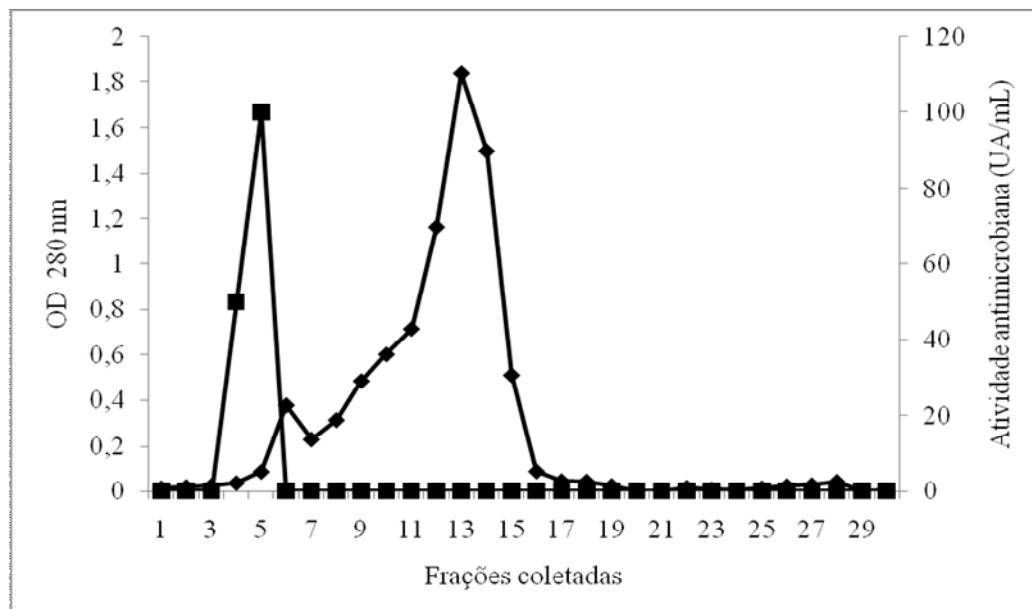


Fig 3 - Perfil de eluição da precipitação (0 - 60%) nas colunas de filtração em gel Sephadex G - 100. A absorbância a 280 nm (◆) e a atividade antimicrobiana em UA / mL (■) foram estabelecidas para cada fração coletada.



Tabelas -

Tabela 1. Resultado da quantificação de bactérias heterotróficas por ponto das amostras de sedimento analisadas.

Pontos	Unidades Formadoras de Colônias/grama
1	$2,1 \times 10^4$ UFC/g de sedimento
2	$1,8 \times 10^4$ UFC/g de sedimento
3	$4,5 \times 10^4$ UFC/g de sedimento
4	$5,8 \times 10^4$ UFC/g de sedimento

Tabela 2. Resultado dos isolados bacterianos analisados através do Maldi-Tof, usando o banco de dados Biotyper 4.0 software MBT OC.

Isolados bacterianos analisados por	Score	Score	Score	Score
Maldi Tof	0.000 –	1.700 –	2.000 –	2.300 –
	1.699	1.999	2.299	3.000
<i>Bacillus megaterium</i> sed 1.4	-	-	2.179	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 1.5	-	-	2.163	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> sed 2.1	-	-	2.072	-
<i>Staphylococcus</i> sp. sed 2.3	-	1.815	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 2.4	-	-	2.038	-
<i>Rumellibacillus</i> sp. sed 2.5	-	1.838	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> sed 2.6	-	-	2.223	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 2.8	-	-	2.049	-
<i>Bacillus</i> sp. sed 3.1	-	1.829	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.3	-	-	2.176	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.4	-	-	2.066	-
<i>Bacillus</i> sp. sed 3.5	-	1.840	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.6	-	-	2.161	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 3.9	-	-	2.221	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 4.2	-	-	2.029	-
<i>Bacillus</i> sp. sed 4.4	-	1.926	-	-
<i>Bacillus</i> sp. sed 4.8	-	1.937	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp. sed 4.9	-	-	2.082	-
<i>Bacillus megaterium</i> sed 4.10	-	-	2.117	-

*Os valores do score são os seguintes: 0.000 – 1.699: identificação não confiável, 1.700 - 1.999: identificação provável do gênero, 2.000 - 2.299: identificação segura do gênero e 2.300 – 3.000: identificação segura da espécie.

Tabela 3. Espectro de ação do sobrenadante bruto com a temperatura ótima de incubação de cada micro-organismo utilizado e os halos de inibição em (mm).

Culturas indicadoras	Temperatura de Incubação (°C)	Medição dos halos em (mm) - Média
Gram Positivas		
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	37	5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	30	9
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> BQ Oxford – 1 (superfície de bancada)	30	10,5
<i>Listeria seeligeri</i> BP Palcam – 2 (superfície de bancada)	30	9
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> PF Oxford – 3 (Presunto fatiado)	30	9
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> MP Oxford – 4 (Mãos)	30	7
<i>Listeria seeligeri</i> ou <i>innocua</i> BP Oxford – 5 (superfície de bancada)	30	9