

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

Luciani Cavalini

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR
Bacillus sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE ÁREAS ÚMIDAS**

Porto Alegre

2019

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

Luciani Cavalini
Bacharela em Biomedicina / Universidade Feevale

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR
Bacillus sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE ÁREAS ÚMIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre (a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta
Co-orientadora: Prof. Dr^a Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Cavalini, Luciani
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE
ÁREAS ÚMIDAS / Luciani Cavalini. -- 2019.
56 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Coorientadora: Ana Paula Folmer Corrêa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Atividade antimicrobiana. 2. *Bacillus* sp. 3.
Listeria sp. 4. Peptídeos bioativos. I. Motta, Amanda
de Souza da, orient. II. Corrêa, Ana Paula Folmer,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ofereço à Deus, por ter me dado força nos momentos de fraqueza,
ânimo nos momentos de tristeza e calma nos momentos de desespero.
Por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.
Obrigada Senhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta, pela oportunidade e ensinamentos. Certamente aprendi lições para toda a vida. Obrigada.

Agradeço à Prof. Dr^a Ana Paula Folmer Corrêa por toda a dedicação, o carinho e amizade. Agradeço pelas longas e reconfortantes conversas. Gratidão por todos os ensinamentos compartilhados e auxílio no laboratório. Mesmo longe, se fez presente. Tenho certeza de que terás um caminho brilhante e de muito sucesso.

Aos meus amigos do Laboratório 222C, sim posso me referir a eles assim, pois foram em todos os momentos verdadeiros anjos, compartilhando comigo suas experiências e momentos.

Obrigada especialmente à Letícia e à Tiela. Obrigada Alberto e Camila Coutinho pela companhia até tarde da noite. Obrigada por tornarem esses períodos mais leves.

Agradeço à minha amiga Jéssica Kurtz por toda a alegria e bom humor, pelas risadas, que com certeza alegraram meus dias, e por todo o teu coleguismo. Tu tens um coração de ouro!

Priscila Jankoski, “Pri” tu te tornaste uma irmã, anjo que Deus enviou pra agir em minha vida! Serei eternamente grata por tua amizade e carinho. Obrigada por tudo!

Diego Bertolini, Mari Lobato e Amanda Domingues, obrigada por tudo! Principalmente pela amizade de vocês!

A todos os colegas do PPGMAA, sempre solícitos, e que de uma forma ou outra contribuíram para esta etapa.

Agradeço ao Laboratório Weinmann - Grupo Fleury, pelo incentivo e oportunidade.

Agradeço de coração as minhas colegas da Microbiologia por todos os momentos que compreenderam a minha ausência e me auxiliaram nas tarefas da rotina, para que eu pudesse completar essa etapa. Agradeço à vocês por serem a minha família todos os dias, pelos conselhos, puxões de orelha e carinho. Agradeço aos coordenadores Lauren, Marcelo e Tarissa, que em suas gestões sempre foram compreensivos e me auxiliaram da melhor maneira. Sempre dispostos a me ouvir e aconselhar.

Gratidão à minha “Miga Ana”. Ana Paula Basso, tu foi certamente outro anjo que Deus me enviou. Tuas palavras, mesmo que as vezes não compreendidas no momento, foram ouvidas. Obrigada pela paciência e por tua amizade. Tu foi essencial em todos os momentos.

Laura, Rafael, Pedro e Tiago: a inocência e o amor de vocês me fizeram mais feliz. Obrigada por nunca esquecerem a dinda, mesmo com o pouco tempo que pude fazer parte dos momentos de vocês. Obrigada Fran, Zeca, Joice e Rodrigo por confiarem a mim essa dádiva de ser madrinha de seus filhos!

Ianaê, Karine e Renata, obrigada irmãs!

Agradeço com todo o meu coração aos meus pais José e Nadir, por todas as oportunidades e ensinamentos. Obrigadas pelas palavras de carinho e muitas vezes firmes, que me fizeram enxergar a vida de outra forma e me confortaram em muitos momentos. Obrigada pelas orações e pela compreensão. Sempre entendendo minha ausência e se fizeram presentes de várias formas.

Aos meus irmãos, Renã e Vanessa, só tenho a agradecer pela parceria e pelo amor de vocês. Sempre dispostos a me fazer companhia nos dias em que precisei.

Thomas, obrigada por todo o incentivo. Obrigada por sempre acreditar em mim. Obrigada por ser essa pessoa tão maravilhosa em minha vida.

Jaque e Darlei, obrigada por me acolherem com tanto carinho, obrigada pela hospitalidade e por todo cuidado. Obrigada por serem sempre tão compreensivos e solícitos.

Emílio, Djeine, obrigada por cuidarem da minha família.

Jaque, Dra Patrícia, obrigada por tudo.

Em especial a Deus, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE ÁREAS ÚMIDAS¹

Autor: Luciani Cavalini
Orientadora: Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta
Coorientadora: Prof. Dr^a Ana Paula Correa Folmer

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos derivados de *Bacillus* sp. apresentam potencial de inibição contra vários patógenos, tornando-os um ponto de partida promissor na busca por novas substâncias antimicrobianas. Esses compostos vêm sendo utilizados em diversas áreas, como na qualidade e segurança alimentar, e na saúde humana. Bactérias isoladas de amostras de sedimentos de áreas úmidas, coletadas na Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS, vem demonstrando a capacidade de inibir diferentes micro-organismos. Dentre estas, um isolado bacteriano apresenta potencial atividade antimicrobiana contra espécies de *Listeria*. Assim, o objetivo desta pesquisa foi identificar e verificar o potencial antimicrobiano de uma bactéria previamente isolada deste sedimento de áreas úmidas. A pesquisa também compreendeu a purificação parcial e caracterização do composto antimicrobiano produzido por esta bactéria. O isolado foi identificado como *Bacillus* sp. sed 1.4 e a substância antimicrobiana produzida foi parcialmente purificada através da precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-200) e membrana de ultrafiltração. Posteriormente, a caracterização foi realizada quanto à sua estabilidade frente a diferentes temperaturas, proteases, solventes orgânicos e detergentes. A massa molecular do peptídeo foi estimada com cerca de 148 kDa por eletroforese desnaturante em gel de poliácridamida. A purificação resultou em uma atividade específica de 769,23 UA/mg. Esta substância antimicrobiana apresentou estabilidade a temperaturas elevadas e quando congelada a -20 °C, foi efetiva frente a espécies de *Listeria*, porém não teve potencial de inibição frente a outros isolados clínicos e de origem alimentar. O espectro de ação apresentado pela substância antimicrobiana parcialmente purificada, se aproxima ao espectro de ação apresentado por bacteriocinas de Classe IIa produzidas por espécies de *Bacillus*, característica que pode ser explorada pela indústria de alimentos.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., Peptídeos bioativos.

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. (78 p.) Março, 2019.

CHARACTERIZATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY PRODUCED BY *Bacillus* sp. ISOLATED SOIL AREAS SEDIMENT ¹

Author: Luciani Cavalini
Advisor: Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta
Co-Advisor: Prof. Dr^a Ana Paula Folmer Corrêa

ABSTRACT

Antimicrobial peptides derived from *Bacillus* sp. have potential for inhibition against several pathogens, making them a promising starting point in the search for new antimicrobial substances. These compounds have been used in many areas, such as food quality and safety, and human health. Bacteria isolated from wetland sediment samples collected at the Conservation Unit (UC) of the Municipal Natural Park Imperatriz Leopoldina, located in the São Leopoldo City/RS, have demonstrated the ability to inhibit different microorganisms. Among these, a bacterial isolate has potential antimicrobial activity against *Listeria* species. Thus, the aim of this research was to identify and verify the antimicrobial potential of a bacterium previously isolated from this sediment of humid areas. The research also included the partial purification and characterization of the antimicrobial compound produced by this bacterium. The isolate was identified as *Bacillus* sp. sed 1.4 and the antimicrobial substance produced was partially purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration liquid chromatography (Sephadex G-200) and ultrafiltration membrane. Subsequently, the characterization was performed for its stability against different temperatures, proteases, organic solvents and detergents. The molecular mass of the peptide was estimated to be about 148 kDa by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Purification resulted in a specific activity of 769,23 AU / mg. This antimicrobial substance showed stability at high temperatures and when frozen at -20 °C, it was effective against *Listeria* species, but had no inhibition potential against other clinical isolates and food source. The action spectrum presented by the partially purified antimicrobial substance is close to the action spectrum presented by Class IIa bacteriocins produced by *Bacillus* species, a characteristic that can be exploited by the food industry.

Keywords: Antimicrobial activity, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., bioactive peptides.

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. (78 p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Micro-organismos de importância clínica	4
3.2 Micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos	6
3.3 Importância da pesquisa por moléculas com potencial antimicrobiano	9
3.4 Ambientes naturais como fonte de micro-organismos produtores de antimicrobiano	11
3.5 Substâncias antimicrobianas produzidas por espécies de <i>Bacillus</i>	12
3.6 Perspectivas para aplicação de peptídeos bioativos na área clínica e de alimentos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Culturas bacterianas	19
4.1.1 Isolado bacteriano	19
4.1.1.1 Identificação do isolado bacteriano por espectrometria de massas	20
4.1.1.1.2 Construção do dendrograma	20
4.1.1.2 Identificação do isolado bacteriano via sequenciamento do gene 16S rRNA	21
4.1.2 Micro-organismos indicadores	21
4.2 Curva de crescimento e produção da substância antimicrobiana pelo isolado bacteriano	23
4.3 Purificação parcial do sobrenadante bruto da bactéria	24
4.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio	24
4.3.2 Cromatografia líquida de gel filtração	25
4.3.3 Membrana de Ultrafiltração	25
4.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis	25
4.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
4.6 Determinação do espectro de ação	27
4.7 Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado	27
4.7.1 Estabilidade térmica	27
4.7.2 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	28

4.7.3 Estabilidade frente a solventes orgânicos e detergentes	28
4.8 Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Identificação do micro-organismo produtor.....	29
5.1.1 Identificação do micro-organismo produtor via MALDI-TOF/MS	29
5.1.1.1 Análise do dendrograma	29
5.1.2 Identificação do micro-organismo produtor via sequenciamento do gene 16S rRNA	30
5.2 Curva de crescimento do <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4 e produção da substância antimicrobiana.....	31
5.3 Purificação parcial da substância antimicrobiana produzida por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	32
5.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio	32
5.3.2 Cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-200).....	33
5.3.3 Membrana de ultrafiltração.....	34
5.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis	34
5.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
5.6 Caracterização da substância antimicrobiana parcialmente purificada produzida por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	36
5.6.1 Estabilidade térmica da substância antimicrobiana.....	36
5.6.2 Estabilidade da substância antimicrobiana frente a enzimas proteolíticas.....	36
5.6.3 Estabilidade da substância antimicrobiana frente a solventes orgânicos e detergentes	37
5.7 Espectro de ação da substância antimicrobiana parcialmente purificada contra isolados provenientes de amostras clínicas e de alimentos.....	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos indicadores para avaliação da atividade antimicrobiana	22
Tabela 2 – Concentração de proteínas solúveis das frações resultantes das etapas de purificação produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	35
Tabela 3 – Atividade residual da substância antimicrobiana do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4 após tratamento térmico	36
Tabela 4 – Efeito de substâncias químicas na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	37
Tabela 5 – Espectro de ação da substância antimicrobiana parcialmente purificada de acordo com o halo de inibição (mm)	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS	20
Figura 2 - Projeção da curva-padrão de albumina sérica bovina para determinação da concentração de proteínas solúveis	26
Figura 3 - Dendrograma das espécies de <i>Bacillus</i> demonstrando os níveis de similaridade da expressão fenotípica das proteínas presentes nos isolados	30
Figura 4 - Árvore filogenética obtida a partir do gene rRNA 16S das seqüências com melhor similaridade sugeridas no BLAST e isolados identificados de outros sedimentos estudados	31
Figura 5 - Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4. O crescimento (•) e atividade antibacteriana (■) foram monitorados durante o crescimento em TSB a 30 °C. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A cepa indicadora foi <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3)	32
Figura 6 - Atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto de <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4, nas diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio avaliado frente a cepa <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	33
Figura 7 - Perfil de eluição do sobrenadante bruto produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4 precipitado (0-60%) em coluna de gel filtração Sephadex G-200. A absorvância (•) e a atividade antimicrobiana (■) foram determinadas para cada fração coletada.....	34
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata apresentando as bandas de proteínas das etapas de purificação parcial da substância antimicrobiana produzida por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4. A: G-200, B: precipitado na faixa de 0-60%, C: sobrenadante bruto, M: marcador molecular	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmpC	Monofosfato cíclico de adenosina
AR	Atividade residual
ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grau Celsius
Da	Daltons
ESBL	Extended Spectrum β -lactamases
H	Horas
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IMP	Imipenem resistente
kDa	Kilodaltons
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
MBL	Metallo- β -lactamase
NDM	New Delhi Metallo- β -lactamase
mg	Miligrama
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
Nm	Nanometro
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
OXA	Oxacilina
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Potencial Hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto
SINAN/SVS	Sistema Nacional de Agravos e Notificações da Secretaria de Vigilância
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
RNA	Ribonucleic acid
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
μ L	Microlitro
VIM	Verona imipenemase
VISA	Vancomycin intermediate-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
UA	Unidades arbitrárias
UC	Unidade de Conservação
\geq	Maior ou igual

1. INTRODUÇÃO

O solo é um sistema complexo, onde coabitam seres vivos das mais variadas espécies. Os micro-organismos que habitam o solo, mantêm uma troca de substâncias com o meio e através da degradação de diferentes materias presentes no ambiente, vários metabólitos secundários são liberados. Assim, explorar micro-organismos do solo e de sedimentos de áreas úmidas por sua multiplicidade de atividades metabólicas é um caminho viável e sustentável para a obtenção de novos compostos antimicrobianos com potencial aplicação na clínica médica e na indústria de alimentos.

Na literatura, muitos micro-organismos são citados como produtores de substâncias antimicrobianas, detectados em muitos perfis de sedimentos de vários ambientes naturais. Um exemplo são as bactérias do gênero *Bacillus*. A capacidade de produzir estes compostos antimicrobianos e a sua capacidade de esporulação conferem às espécies de *Bacillus* uma vantagem significativa em termos da sua sobrevivência em diferentes habitats. As espécies de *Bacillus* produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos, além dos antibióticos, como por exemplo peptídeos antimicrobianos.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é atualmente uma ameaça global à saúde pública, refletindo em consequências clínicas e econômicas preocupantes, relacionadas com o aumento das taxas de morbidade e mortalidade. Considerado o fator mais expressivo na seleção de micro-organismos resistentes, o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, tanto na saúde humana quanto na veterinária, contribui para a seleção de bactérias resistentes. Estes micro-organismos podem tornar-se predominantes e com capacidade de transferir material genético para bactérias suscetíveis, que então adquirem resistência. Alimentos de origem animal são potenciais veículos transmissores de genes de resistência e esta contaminação pode ocorrer em toda a cadeia produtiva, da produção primária até o consumo.

A deterioração de alimentos, causada por micro-organismos, também resulta em perdas econômicas e problemas sanitários significativos, além de surtos de doenças originadas por alimentos contaminados. Um problema bastante preocupante para a indústria de alimentos é a presença da bactéria *Listeria*

monocytogenes, um patógeno de origem alimentar presente em alimentos crus e processados, podendo se multiplicar com facilidade durante o período da estocagem, em produtos como queijos e embutidos, além de carnes e vegetais crus. O controle de *L. monocytogenes* é bastante desafiador, visto que este patógeno está relacionado à resistência a diversas condições ambientais e multiplica-se a temperaturas baixas.

A atual busca por uma alimentação mais saudável instiga a busca por substâncias mais naturais para a conservação de alimentos. Substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias têm sido investigadas quanto a sua potencial aplicação na preservação de alimentos. Alguns estudos já demonstraram atividade antilisteria, por exemplo, utilizando bacteriocinas.

Desta forma, aperfeiçoar a busca por fontes de micro-organismos produtores de substâncias antimicrobianas tem sido um tema promissor de estudo. Assim, o objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente e caracterizar uma substância produzida por uma bactéria isolada de amostra de sedimentos de áreas úmidas, coletada na Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, a fim de verificar o seu potencial antimicrobiano contra patógenos clínicos e de origem alimentar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção da substância antimicrobiana produzida pela bactéria isolada de amostra de sedimentos de áreas úmidas, coletada na Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo – RS - Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a potencial produção de substâncias antimicrobianas pelo isolado bacteriano das amostras de sedimento;
- Identificar o isolado bacteriano via sequenciamento do gene 16S rRNA e espectrometria de massas;
- Purificar parcialmente através dos métodos de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração e membrana de ultracentrifugação;
- Caracterizar a substância antimicrobiana produzida quanto a estabilidade térmica, enzimas proteolíticas, solventes orgânicos e detergentes;
- Avaliar o espectro de ação da substância estudada frente a isolados de origem clínica e alimentar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Micro-organismos de importância clínica

A prevalência de micro-organismos resistentes à múltiplos antimicrobianos representa uma ameaça importante para a saúde pública e está associada à morbidade e mortalidade significativas. A exposição aos fármacos, hospitalização frequente ou de longa duração, o uso de dispositivos como cateteres e sondas, além da imunidade do hospedeiro, fornecem riscos para a colonização de micro-organismos resistentes (LOGAN & WEINSTEIN, 2017).

O isolamento de micro-organismos resistentes tem crescido acentuadamente, sendo que as bactérias gram-positivas mais resistentes são as espécies *Staphylococcus aureus*, resistentes ou com sensibilidade intermediária à vancomicina (*Vancomycin – Intermediate/Resistant Staphylococcus-VISA/VRSA*) e meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (*Vancomycin-resistant Enterococcus - VRE*). Entre as gram-negativas de maior relevância, estão as espécies *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes aos carbapenêmicos e/ou polimixina, e a família Enterobacteriaceae, resistentes aos carbapenêmicos (LOUREIRO et al., 2016).

Grande parte destes patógenos são comensais, como os membros da família Enterobacteriaceae, bacilos gram-negativos que habitam o trato gastrointestinal. Porém, também representam 80% ou mais de todos os gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. Enterobactérias podem causar vários tipos de doenças, incluindo doenças diarreicas, infecções em feridas e queimaduras, infecções respiratórias, meningite, sendo responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias (PATERSON, 2013).

Bacilos gram-negativos classificados como não fermentadores, também são de grande importância nos casos de infecção relacionada com assistência à saúde. *P. aeruginosa* e *A. baumannii* estão entre as bactérias frequentemente isoladas em hemoculturas e amostras do trato respiratório em grandes hospitais (OLIVEIRA et al., 2017). Micro-organismos como *Pseudomonas* spp. são encontrados no solo, água, em matéria orgânica e na vegetação, podendo ser encontrado também no ambiente hospitalar e em reservatórios úmidos. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta diversos mecanismos de resistência intrínseca

e adquirida, resultando frequentemente em uma multirresistência, favorecida pelo intenso uso de antimicrobianos nos ambientes hospitalares. Esse patógeno é responsável por cerca de 80% das infecções crônicas, infectando as vias aéreas em indivíduos com fibrose cística, sendo relacionado com a diminuição da função pulmonar e insuficiência respiratória (RYALL et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Acinetobacter spp. também está presente em diversos ambientes, como solos, água doce, oceanos e sedimentos. Características metabólicas versáteis permitem que espécies desse gênero catabolizem uma ampla gama de compostos naturais, implicando em uma participação ativa no ciclo de nutrientes no ecossistema. Por outro lado, *A. baumannii* resistentes vêm causando infecções nosocomiais com alta mortalidade, causando muita preocupação na medicina humana. *Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista comumente associado a surtos em hospitais e está associado mais comumente à infecção do trato respiratório inferior, corrente sanguínea, pele (queimados), tecidos moles e infecções do trato urinário (OLIVEIRA et al., 2017; MARTÍN-ASPAS et al., 2018; VAN DER KOLK et al., 2018).

Outros cocos gram-positivos abrangem bactérias comensais do intestino humano e animal, além do trato geniturinário e pele, como o gênero *Enterococcus*. Atualmente, existem mais de 40 espécies de *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as mais frequentemente recuperadas em amostras clínicas, relacionadas de 80 até 90% das infecções causadas por este gênero. Associados principalmente às infecções em ambiente hospitalar, as espécies de *Enterococcus* podem causar bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, infecções de tecidos moles e intra-abdominais, sepse neonatal e não muito frequente, meningites. Estão envolvidos com maior frequência com pielonefrite e cistite (GUZMAN PRIETO et al., 2016).

Indivíduos sadios são colonizados intermitentemente por *S. aureus* desde a amamentação e podem portar o micro-organismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na vagina. Porém quando há descompensação imunológica, estão associadas a dermatite, eczema e úlceras crônicas da pele. Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são de 5 a 10% invasivas e muitas vezes estão associados à bacteremia, causando infecções letais por conta dos fatores de

virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados (CHAMBERS et al., 2016; ALARCON-LAVIN et al., 2017).

Deste modo, o uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para emergência e a disseminação da resistência microbiana (CEBRIÁN et al., 2018).

3.2 Micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos

Com a atual consciência da importância da segurança de alimentos, uma vez que alguns dos aditivos químicos utilizados nos alimentos são potencialmente prejudiciais à saúde, tem-se buscado também recursos naturais para a conservação dos alimentos (YANG et al., 2014). A presença de agentes patogênicos em produtos alimentares impõe risco potencial para os consumidores e provoca graves perdas econômicas. Doenças transmitidas por alimentos têm um grande impacto na economia e na saúde pública em todo o mundo (WAJID et al., 2018).

Doenças transmitidas por alimentos são originadas por alimentos aparentemente normais, sem alterações de odor ou sabor, e são causadas por diversos micro-organismos, variando o tempo de incubação destes e de duração da doença. Doenças causadas por micro-organismos transmitidos através de alimentos são normalmente divididos em infecções alimentares e intoxicações alimentares (KADARIYA et al., 2014; SARAQUI et al., 2016).

No Brasil os dados do Sistema Nacional de Agravos e Notificações da Secretaria de Vigilância em Saúde (SINAN/SVS), Ministério da Saúde, atribuem como agente etiológico mais identificado em surtos de doenças transmitidas a *Salmonella*, com incidência de aproximadamente 35% dos casos identificados. Infecções causadas por *Escherichia coli* apresentam aproximadamente 28% de incidência, *S. aureus* 18% dos surtos, seguido de outros agentes de origem alimentar com cerca de 5% de incidência no período compreendido entre 2000 e 2017 (BRASIL, 2018).

Infecções de origem alimentar podem ser causadas por micro-organismos que aderem à mucosa do intestino e se multiplicam, colonizando o trato gastrointestinal do hospedeiro, podendo ocorrer a invasão da mucosa e penetração nos tecidos (GOGOI et al., 2018). Entre os principais micro-organismos causadores

de infecção de origem alimentar, está a *Salmonella* spp., considerada o agente causador da zoonose mais difundida do mundo, causando também perdas econômicas. A infecção por *Salmonella* está associada a ingestão de alimentos como carnes, ovos e produtos lácteos e água contaminada (GODOI et al., 2018). Os sorovares zoonóticos de *Salmonella enterica*, particularmente Typhimurium e Enteritidis, representam uma ameaça global contínua à indústria avícola e à saúde pública (WAJID et al., 2018). *Salmonella* é um patógeno que causa uma variedade de doenças, desde infecções sistêmicas com risco de vida, como febre tifoide causada por *Salmonella* Typhi, até gastroenterites leves em humanos causadas por *Salmonella* Paratyphi (A, B, C) e as enterocolites (FRANCO & LADGRAF, 2005; BROZ et al., 2012).

Já infecções de origem alimentar causadas por *E. coli* estão associadas às práticas inadequadas de higiene pessoal e alimentar e sua transmissão é fecal-oral. Os alimentos suscetíveis à contaminação são carnes, hortaliças, leite e água não tratada. O problema envolvendo *E. coli* está associado sobretudo a isolados patogênicos. Com base nos fatores de virulência, as cepas patogênicas de *E. coli*, causadoras de distúrbios em homens e animais, são divididas em dois grupos: as causadoras de diarreia (DEC) e as patogênicas extraintestinais (EXPEC). O primeiro grupo são as bactérias que provocam problemas de ordem intestinal classificadas em enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterro-hemorrágica (EHEC) e enteroagregativa (EaggEC). O grupo das extraintestinais são: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC), responsáveis por uma variedade de infecções, incluindo as complicações no trato urinário, meningite e septicemia, respectivamente (BRITO et al., 2006; LOPES et al., 2017).

A bactéria *Listeria monocytogenes* é responsável por infecções oportunistas, geralmente se manifesta por septicemia, meningoencefalite ou infecções associadas à gravidez. Após a ingestão de alimentos contaminados com esta bactéria, esta atinge o trato intestinal aderindo e invadindo a mucosa. Listeriose ocorre principalmente em grupos específicos de risco, como em gestantes, idosos ou imunocomprometidos e os sintomas mais comuns são: febre, fadiga e dor de cabeça. A origem alimentar de *L. monocytogenes* está associada à resistência a diversas condições ambientais e a capacidade de multiplicar-se a temperaturas

baixas. É encontrada em uma variedade de alimentos crus e processados, podendo se multiplicar com facilidade durante o período da estocagem, em produtos como queijos e embutidos, além de carnes e vegetais crus (SARAOUI et al., 2016; CHERSICH et al., 2017).

Intoxicações de origem alimentar, são causadas por um grupo de micro-organismos que produzem tanto toxinas durante a sua proliferação no alimento, quanto após a ingestão do alimento pelo hospedeiro. Também pode haver intoxicação alimentar a partir da ingestão de substâncias químicas presentes nos alimentos, como pesticidas, agrotóxicos, metais pesados (NUNES et al., 2016; ERCOLI et al., 2017).

Os estafilococos coagulase positiva são agentes microbianos responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. Essa intoxicação se dá pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos contaminados por esses micro-organismos. As causas mais comuns de doenças transmitidas por alimentos causadas por *Staphylococcus aureus* são enterotoxinas estafilocócicas clássicas produzidas pela bactéria, dos tipos A, B, C, D e E. Estas toxinas são proteínas básicas constituídas por 220-240 aminoácidos e têm pesos moleculares semelhantes de 25-30 kDa. Outros tipos de enterotoxinas ou superantígenos (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU e SEV) também foram descritas e avaliadas. O aparecimento de sintomas, como náuseas, vômitos intensos, diarreia, dor abdominal e cefaleia ocorrem de 2 a 8 horas após a ingestão do alimento. A gravidade da doença depende da quantidade de toxina ingerida e da saúde do consumidor. Os alimentos mais envolvidos são leite e derivados, frango e presunto (ERCOLI et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Bacillus cereus são de particular interesse na segurança alimentar e saúde pública, pelo fato de que este micro-organismo causa deterioração de alimentos, além de doenças através da produção de toxinas. Esta bactéria é encontrada principalmente em cereais, leites e derivados, carnes, alimentos desidratados e temperos acondicionados de maneira inadequada. Além disso, é um patógeno oportunista que pode causar provocar duas síndromes, de acordo com a toxina produzida, a síndrome diarreica, que está ligada a três enterotoxinas hemolíticas e a síndrome emética (cereulida) (OWUSU-KWARTENG et al., 2017; HEINI et al., 2018).

Além de causar doenças, alguns micro-organismos ainda podem ocasionar deterioração dos alimentos, como *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp., *Shewanella putrefaciens*, *B. cereus*, *Clostridium* sp. e algumas espécies da Família *Enterobacteriaceae*, além de leveduras e fungos filamentosos (ALCANTARA et al., 2012). A deterioração bacteriana pode causar alterações nas características físicas e químicas dos produtos, e o tipo de deterioração varia de acordo com as condições e com a temperatura de armazenamento dos produtos (HAVELAAR et al., 2015). A deterioração bacteriana provoca perdas econômicas significativas para a indústria alimentar devido a estas alterações nas características do produto. Micro-organismos psicrófilos deteriorantes de alimentos são de uma preocupação particular para a indústria, como *Pseudomonas* sp., que tem limitado a vida de prateleira do leite processado, carnes e derivados (ARSLAN & OZDEMIR, 2011; MANRIQUE et al., 2016).

3.3 Importância da pesquisa por moléculas com potencial antimicrobiano

Substâncias antimicrobianas podem ser produzidas por animais, plantas, insetos e micro-organismos, tais como peróxido de hidrogênio, ácidos graxos, ácidos orgânicos, etanol, antibióticos e bacteriocinas. Essas substâncias podem resultar das interações de organismos entre si e com o ambiente, e conseqüentemente irão desempenhar funções específicas nestas associações (CONTI et al., 2012).

O primeiro antibiótico clinicamente útil foi descoberto por Alexander Fleming em 1928 como um produto derivado de *Penicillium notatum*, porém a sua purificação, isolamento e estrutura não eram conhecidos. O período de 1940 até o final da década de 1960 ficou conhecido como “era de ouro”, quando pesquisas resultaram na identificação de um arsenal robusto de antimicrobianos eficazes a partir de fontes naturais para tratar infecções microbianas. No início da década de 1940, descobriu-se a actinomicina e os aminoglicosídeos, incluindo estreptomicina e neomicina. Em 1948, pesquisas encontram clorotetraciclina, também produzido por *Streptomyces aureofaciens*, que foi aprovado para o uso naquele ano contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em seguida, derivado de *Streptomyces venezuelae*, surge o cloranfenicol, que mais tarde foi obtido por síntese em escala industrial (WALSH, 2003; BROWN, 2006; TENOVER, 2006; DEMAÏN, 2014).

No entanto, a descoberta de novas classes de antimicrobianos teve um declínio constante nas últimas décadas, devido ao desafio de identificar novos produtos, tanto moléculas de origem natural quanto o desenvolvimento de produtos sintéticos, que sejam atóxicos (MOELLERING, 2011; SILVER, 2017).

A resistência e a toxicidade dos antimicrobianos disponíveis tornaram imperativa a busca de estratégias para a descoberta de novos compostos. A tecnologia para a detecção de novos micro-organismos produtores de potenciais compostos bioativos são ferramentas de apoio, que auxiliam na identificação e na avaliação da atividade das novas substâncias antimicrobianas. Isto é devido aumento do conhecimento da fisiologia microbiana, de bioinformática, de química e de biossíntese combinatória, de engenharia metabólica, arranjo genético e da evolução dirigida de proteínas (GUZMÁN-TRAMPE et al., 2017; MAHAJAN & BALACHANDRAN, 2017).

A busca por fontes de micro-organismos produtores de substâncias antimicrobianas tem sido explorada em diversos ambientes, como nascentes, gêiseres e cavernas (MAHAJAN & BALACHANDRAN, 2017), amostras de solo, (SHAH et al., 2017; HOVER et al., 2018), sedimentos (CHEN et al., 2017; QUINTERO et al., 2018) e derivados de fontes vegetais e animais (HELAL et al., 2018).

Peptídeos bioativos, que apresentam efeitos antimicrobianos, possuem aplicações potenciais na qualidade e segurança alimentar e ainda podem ter efeito antimicrobiano contra patógenos clínicos. Considerando as demandas dos consumidores por alimentos menos processados e mais naturais, esforços crescentes estão voltados para a caracterização destes compostos (BRANDELLI et al., 2015; MATHUR et al., 2017).

Na biotecnologia de alimentos, a pesquisa por substâncias antimicrobianas concentrou-se principalmente em bacteriocinas, produzidas por bactérias ácido lácticas, e suas aplicações como bioconservantes de alimentos contra patógenos de origem alimentar e bactérias de deterioração de alimentos (BALI et al., 2016; ZOU et al., 2018).

Mais recentemente, aplicações de peptídeos antimicrobianos relacionados a saúde, são descritas. Mathur e colaboradores (2017) revisaram estudos nos quais as bacteriocinas foram consideradas efetivas em combinação

com outros antimicrobianos, com o objetivo de atingir patógenos clínicos ou de origem alimentar e compensar a escassez de novos antimicrobianos. Bernat e colaboradores (2016) demonstraram que o extrato sintetizado pela linhagem *Bacillus subtilis* I1a, contendo principalmente iturina A e fengicina, foi ativo contra as bactérias nas formas planctônicas e sésseis isoladas de biofilmes de catéter urinário. Este extrato demonstrou um efeito sinérgico entre iturina A e fengicina na erradicação de uropatógenos, como *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp.

3.4 Ambientes naturais como fonte de micro-organismos produtores de antimicrobianos

O solo é um sistema dinâmico e complexo, onde os seres vivos das mais variadas espécies estabelecem relações entre si, através da troca de substâncias e da degradação de diferentes elementos. Neste sistema, ocorrem transformações nas biomoléculas e metabólitos secundários são liberados. A distribuição estratificada de comunidades bacterianas tem sido detectada em diferentes ambientes naturais (ZHOU et al., 2017).

A produção de antibióticos é uma característica bastante estudada especialmente pelo gênero *Streptomyces*. Dentre os antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* estão os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, fosfomicina e poliênicos (CHATER, 2016; BALTZ, 2016).

Shah e colaboradores (2017) isolaram actinomicetos de amostras do solo coletadas de uma região dos Himalaias, onde foi testada a atividade antimicrobiana de 121 isolados contra diferentes micro-organismos patogênicos. Dentre os isolados destacou-se *Streptomyces pratensis*, cujo extrato foi submetido a várias técnicas de cromatografia que levaram ao isolamento de quatro compostos, demonstrando uma potente atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*.

A pseudouridimicina (PUM) produzida por *Streptomyces* sp., encontrado em uma amostra de solo coletada na Itália, inibe o crescimento de uma ampla gama de patógenos gram-negativos e gram-positivos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pyogenes*, sem resistência cruzada com drogas antibacterianas utilizadas atualmente (MAFFIOLI et al., 2017; SOSIO et al., 2018).

Micro-organismos associados aos sedimentos costeiros do Mar do Caribe colombiano foram isolados e avaliados quanto sua atividade antimicrobiana.

Uma triagem foi realizada usando o método de difusão em ágar contra os patógenos *Escherichia coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *P. aeruginosa*. Dos 104 isolados, 17 linhagens mostraram atividade antimicrobiana e foram identificadas como membros dos gêneros *Streptomyces*, *Micrococcus* e *Bacillus*, sendo *Bacillus* o gênero predominante. Foram encontradas porcentagens de inibição de crescimento superiores a 90% sobre MRSA e *C. albicans*. Os autores sugerem que os resultados podem contribuir para o potencial biotecnológico da biodiversidade, com o desenvolvimento de produtos farmacêuticos que podem neutralizar o crescente problema da resistência a patógenos (QUINTERO et al., 2018).

Um estudo conduzido na Índia avaliou uma bactéria isolada de plantas do nordeste do país quanto à produção de substâncias inibitórias. Esta bactéria foi testada contra patógenos e agentes deteriorantes de alimentos, demonstrando atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* e *Clostridium perfringens*. A bactéria foi identificada como *Brevibacillus borstelensis*. A bacteriocina produzida pelo isolado foi purificada e caracterizada, demonstrando estabilidade térmica à 100 °C. Com relação ao pH, obteve a atividade máxima em pH neutro. A sensibilidade da bacteriocina às enzimas proteolíticas foi também avaliada, indicando tratar-se de uma substância de natureza proteica (SHARMA et al., 2014).

A fim de explorar recursos naturais para contribuir com a produção de antimicrobianos clinicamente importantes, independente de cultura de micro-organismos, Hover e colaboradores (2018) analisaram o DNA extraído de amostras de solo através do sequenciamento de genoma, análise de bioinformática e expressão gênica. Neste trabalho, os autores descreveram a aplicação de plataformas para a descoberta das malacidinas e lipopetídeos comumente codificados em microbiomas do solo. As malacidinas mostraram-se ativas contra *S. aureus* resistentes à metilina.

3.5 Substâncias antimicrobianas produzidas por espécies de *Bacillus*

Membros do gênero *Bacillus* são bactérias gram-positivas, aeróbias e formadoras de endósporos, caracterizadas pela morfologia celular em forma de bastonete e produção de catalase. São encontrados em diversos ambientes, como

solo e argila, rochas, poeira, ambientes aquáticos, vegetação, alimentos e trato gastrointestinal de diferentes animais (SUMI et al., 2015; BOOTTANUN et al., 2017).

A família Bacillaceae, incluindo *Bacillus* spp., *Brevibacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Aneuribacillus* sp., e *Halobacillus*, são fonte de peptídeos estruturalmente diversificados, exibindo atividade antimicrobiana contra vários patógenos, tornando-os um ponto de partida promissor na busca por novas substâncias inibitórias (SALAZAR et al., 2017; ZHAO et al., 2018). A capacidade de produzir substâncias antimicrobianas aliado à sua capacidade de esporulação, confere às espécies de *Bacillus* uma vantagem significativa em termos da sua sobrevivência em diferentes habitats. As espécies de *Bacillus* produzem uma grande variedade de compostos biologicamente ativos, incluindo policetídeos, lipopeptídeos, sideróforos e peptídeos (EBRAHIMIPOUR et al., 2014; DIMKIC et al., 2017; BELTRAN et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

Peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em duas classes, dependendo da sua biossíntese: a classe I inclui pequenos peptídeos antimicrobianos sintetizados por grandes complexos enzimáticos (não ribossomicamente), enquanto a classe II compreende peptídeos sintetizados por ribossomos, caracterizados como bacteriocinas (YE et al., 2013; SUMI et al., 2015). Peptídeos não ribossomais são de grande importância para a indústria farmacêutica devido à sua ampla atividade biológica, o que os coloca entre os produtos naturais com maior potencial para a descoberta de novos fármacos. Por outro lado, peptídeos ribossomais são proteínas complexas com atividade bactericida contra espécies intimamente relacionadas com os micro-organismos produtores, variam em peso molecular, nas propriedades bioquímicas, espectro e mecanismo de ação (GONZALEZ et al., 2016; SALAZAR et al., 2017).

Segundo Zhao e colaboradores (2018), a classificação de peptídeos antimicrobianos derivados da Família Bacillaceae é dividida em cinco categorias distintas, classificados de acordo com sua massa e estrutura química. São eles os lipopeptídeos, 2,5-dicetopiperazinas (DKPs), tiopeptídeos, peptídeos cíclicos típicos e peptídeos lineares.

Vários antibióticos peptídicos que são de importância farmacêutica, tais como bacitracina, polimixina, gramicidina, tirocidina, subtilina e bacilisina, são produzidos por espécies de *Bacillus*. Um dos polipeptídeos mais importantes é a

bacitracina, que efetivamente inibe o crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *S. aureus*. Polimixina B e polimixina E, isoladas de *Bacillus polymyxa* são antibióticos lipopeptídicos. As polimixinas têm forte atividade contra bactérias gram-negativas incluindo *Enterobacteriaceae* e espécies não fermentadoras de glicose (SHARMA et al., 2014; DUARTE et al., 2014).

Bacillus sp. P34 foi isolado de intestino de peixe (*Leporinus* sp.) na Bacia Amazônica. A atividade antimicrobiana deste *Bacillus* foi detectada e caracterizada. A substância foi capaz de inibir uma ampla gama de micro-organismos indicadores, incluindo bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Erwinia carotovora*, *Pasteurella haemolytica* e *Salmonella Gallinarum*. A identificação de substâncias inibidoras do tipo bacteriocina, que possuem amplo espectro de ação, aborda um importante aspecto para proteção de alimentos contra patógenos e deteriorantes de alimentos (MOTTA et al., 2007).

Lipopeptídeos foram isolados de *Bacillus* sp. KCB14S006 em ambiente hipersalino natural por Son e colaboradores (2016). O estudo resultou no isolamento de três compostos de iturina que foram testados quanto às suas atividades antimicrobianas, citotoxicidade, bem como suas atividades de inibição enzimática. Todos os compostos avaliados exibiram atividades antifúngicas, contra *Aspergillus flavus*, *Neurospora crassa*, *Candida albicans* e *Penicillium griseofulvum*. A descoberta das iturinas e suas bioatividades sustentam a importância de pesquisas por bactérias isoladas de diferentes ambientes como fontes promissoras de moléculas bioativas (SON et al., 2016).

Uma bactéria produtora de uma substância antimicrobiana isolada da pele de rã, *Rana ridibunda*, foi identificada como *Bacillus atrophaeus*. Para caracterizar o composto antimicrobiano produzido, o sobrenadante da cultura foi parcialmente purificado. O composto antimicrobiano apresentou amplo espectro e foi estável no intervalo de temperatura entre 25 °C e 100 °C e ativo em um pH amplo de 2,0 a 11,0. A produção máxima do composto antimicrobiano foi alcançada a 30 °C e pH 7. Os autores sugerem que essas propriedades tornam o composto uma ferramenta não só para prevenção e tratamento de infecções, mas para ser considerado como um possível conservante em indústrias alimentícias para evitar a deterioração de

alimentos. No entanto, mais estudos sobre purificação e caracterização do antimicrobiano seriam necessários (EBRAHIMIPOUR et al., 2014).

Metabólitos secundários produzidos a partir de isolados de *Bacillus amyloliquefaciens*, N2-4 e N3-8, foram parcialmente purificados e parcialmente caracterizados, demonstrando capacidade de inibir várias cepas de *Burkholderia pseudomallei* de fontes clínicas e ambientais, incluindo isolados resistentes a antimicrobianos. Os compostos também foram capazes de inibir outras bactérias gram-positivas e gram-negativas como *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium* e *Clostridium difficile*, revelando amplo espectro de ação. A atividade antimicrobiana do sobrenadante da cultura de N2-4 foi diminuída pelo calor e completamente destruída por enzimas proteolíticas, portanto, sugere-se que os compostos ativos sejam compostos proteicos. Para N3-8, o calor e enzimas proteolíticas só foram capazes de diminuir parcialmente a atividade, o que os autores sugerem ser devido à natureza lipopeptídica ou policetídic (BOOTTANUN et al., 2017).

Bacillus pumilus isolado de água, produziu um composto que apresentou atividade antibacteriana notável contra MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e VRE (*Vancomycin-resistance enterococcus*). A bacteriocina foi a primeira a ser descrita na literatura produzida pelo isolado, designada como pumilicina 4. Quanto à estabilidade ao calor, a bacteriocina manteve atividade em até 121 °C por 15 min e foi ativa quando em pH 6 a 9. Sua atividade desapareceu quando tratada com enzimas proteolíticas, demonstrando sua natureza proteica. Foi solúvel em solventes orgânicos, como etanol e metanol, sugerindo uma natureza hidrofóbica. O peso molecular foi determinado em 1994,62 Da quando analisada em espectrometria de massa (AUNPAD & NA-BANGCHANG, 2007).

Dimkic e colaboradores (2017) investigaram métodos para a detecção rápida e confiável de cepas de *Bacillus* isolados de solo, que podem produzir metabólitos com potencial uso em biocontrole e identificaram cinco linhagens de *Bacillus* produtoras de lipopeptídeos. A cromatografia em camada delgada de alto desempenho foi utilizada para a separação simultânea de misturas complexas de extratos de lipopeptídeos. Utilizou-se MALDI-TOF/MS, como técnica rápida e eficaz para a identificação destes compostos distintos nos extratos. Todos os antimicrobianos separados desta pesquisa mostraram potentes efeitos contra *Xanthomonas arboricola* e *Pseudomonas syringae*.

Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus licheniformis* isolados a partir de sedimentos marinhos, demonstraram atividade de inibição significativa contra *Vibrio parahaemolyticus*. Purificados por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, os lipopeptídeos mostraram boa resistência à luz UV e à mudança de pH e temperatura (CHEN et al., 2017).

Lee e colaboradores (2016) identificaram e caracterizaram uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus* sp. LM7 isolado de soja. A substância apresentou um espectro de inibição significativo, mais amplo do que a nisina e a polimixina B. Foram sensíveis à substância antimicrobiana produzida pelo isolado, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* e *E. faecalis*, além de fungos pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

Bacillus são encontrados em diversos ambientes e são potenciais fontes de peptídeos bioativos. A maioria das espécies do gênero *Bacillus* são consideradas importantes produtoras de substâncias antimicrobianas, como lipopeptídeos e bacteriocinas. A busca por espécies de *Bacillus* produtores de substâncias antimicrobianas em diferentes ambientes tem se tornado uma ferramenta valiosa (EBRAHIMPOUR et al., 2014; BELTRAN et al., 2018).

3.6 Perspectivas para aplicação de peptídeos bioativos na área clínica e de alimentos

O estudo de peptídeos bioativos tem sido o foco de várias investigações relacionadas principalmente a explorar suas atividades antioxidantes, anti-hipertensivas, atividades antitumorais, antivirais, antiparasitárias e antimicrobianas (BRANDELLI et al., 2015; BELTRAN et al., 2018). Atividade antimicrobiana produzida por peptídeos derivados de *Bacillus* sp. tem potencial na indústria farmacêutica, assim como nos setores alimentícios como conservantes de alimentos, e agrícola para inibir patógenos de plantas e preservar grãos (SUMI et al., 2015). O potencial terapêutico das bacteriocinas nas infecções bacterianas locais e sistêmicas está atualmente em estudo, destacando sua importância como alternativa viável ou como complemento aos antibióticos atualmente utilizados, considerando o alarmante aumento das resistências aos antimicrobianos (CEBRIÁN et al., 2018).

Para avançar na produção de alimentos de forma mais segura e sustentável, antimicrobianos produzidos por micro-organismos têm sido

tradicionalmente aplicados para aumentar a segurança na conservação de alimentos. Isso é bem exemplificado pelo uso de bacteriocinas como antimicrobianos alimentares, como o uso de nisina em produtos derivados do leite. Bacteriocinas são facilmente inativadas por enzimas digestivas, o que caracteriza estas moléculas como seguras para aplicação na conservação de alimentos (DUARTE et al., 2014; MARTÍNEZ et al., 2018; ZOU et al., 2018).

Atualmente, as únicas bacteriocinas comercializadas nos EUA e no Canadá são nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, pediocina, produzida por *Pediococcus acidilactici*, e Micocin®, uma combinação de três bacteriocinas (Carnociclina A, Carnobacteriocina BM1, e Piscicolina 126) produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 (ZOU et al., 2018). Porém, apenas a nisina é aprovada pela Organização Mundial de Saúde desde 1969, sendo a única bacteriocina largamente comercializada e utilizada como conservante de alimentos em mais de 40 países, incluindo o Brasil (GARSA et al., 2014).

Estudos mostram que a nisina tem atividade antibacteriana de amplo espectro e é usada como um antimicrobiano contra muitas bactérias que são deteriorantes de alimentos. A nisina também pode ser potencialmente utilizada para controlar infecções por *C. difficile* entre humanos, uma vez que é um inibidor eficaz das células vegetativas e da germinação de esporos (LE LAY et al., 2016; SEAL et al., 2018).

A eficácia da biopreservação de um peptídeo antibacteriano parcialmente purificado, produzido por *Bacillus licheniformis* Me1, foi avaliada por meio de aplicação direta no leite e em produtos alimentícios à base de leite. A adição do peptídeo em amostras de leite armazenadas resultou na inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus*, o que aumentou em 4 dias a vida útil de amostras de leite, enquanto que a coagulação e o odor foram notados em amostras sem adição do peptídeo. O efeito antilisteria também foi observado, em amostras de queijos tratados com a adição do peptídeo. Estes resultados indicam que os peptídeos produzidos por *B. licheniformis* Me1 podem ser utilizados como bioconservantes para controlar o crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, como *L. monocytogenes*, *M. luteus* e *S. aureus*, reduzindo assim o risco de doenças transmitidas por alimentos (NITHYA et al., 2018).

Além de seu papel na biopreservação de alimentos para aumentar o

prazo de validade dos alimentos e reduzir o uso de aditivos químicos, surgem novas aplicações de bacteriocinas e peptídeos antimicrobianos na saúde, como exemplos de substâncias anti-infecciosas e moduladoras da microbiota intestinal (MARTÍNEZ et al., 2018).

Lipopeptídeos são produzidos por *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. e *Aspergillus* sp. e sua aplicação em produtos cosméticos foi aumentada devido às suas propriedades e diversas atividades biológicas, incluindo atividades antioxidantes. Além disso, lipopeptídeos são usados na biorremediação devido a suas propriedades como redutores de viscosidade e solubilização de hidrocarbonetos (HMIDET et al., 2017).

Um estudo realizado por Cebrián e colaboradores (2018) demonstra a alta suscetibilidade de vários isolados clínicos de *Propionibacterium acne* de diferentes fontes (pele, osso, exsudato de feridas, abscesso ou contaminação de sangue) à bacteriocina AS-48. Isso forneceu a base para o desenvolvimento de formulações tópicas para a acne ou para aplicação em infecções associadas a biofilme em implantes. AS-48 demonstrou-se como um agente terapêutico útil contra essa bactéria, além de que sua associação com lisozima promoveu resultados cooperativos.

Uma atenção significativa tem sido direcionada para as propriedades antibacterianas da surfactina. Estudos observaram que a surfactina poderia reduzir a formação de biofilme em cateteres urinários por *Salmonella enterica*. Uma redução na formação de biomassa de biofilme na presença de surfactina também foi observada para *Legionella pneumophila*. O extrato obtido pela linhagem *Bacillus subtilis* I1a exibiu efeito inibidor contra as formas planctônicas e sésseis de *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* e *E. faecalis*, bactérias uropatogênicas que foram isoladas de biofilmes em cateter urinários (BERNA et al., 2016).

Uma perspectiva para combater infecções são os peptídeos antimicrobianos, porém muitos obstáculos devem ser vencidos antes que estes possam ser disponibilizados na clínica e comércio, como a estabilidade, toxicidade contra células eucarióticas e altos custos de produção (LIU et al., 2018).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Culturas bacterianas

4.1.1 Isolado bacteriano

O isolado bacteriano produtor de atividade antimicrobiana foi proveniente de um estudo anterior, onde foram realizadas coletas de sedimento de áreas úmidas na Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS (dados não publicados).

O Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina está localizado no município de São Leopoldo/RS (S 29°45' 37" e W 51°08' 50") (Figura 1) e parte da área está inserida dentro da bacia de inundação do rio dos Sinos. A Unidade de Conservação do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina (PNMIL) foi criada através do Decreto 4.330/2005 pela Secretaria Municipal do Meio Ambiente em 2016 (SEMMAM) 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.

As coletas de sedimento foram realizadas em uma área úmida da UC Imperatriz Leopoldina no mês de dezembro de 2016. A amostra de sedimento foi coletada do Ponto 1: S 29°45'374"/ W 51°07'992, ponto amostral localizado próximo à margem do banhado e com algumas espécies arbustivas em sua volta. Foram coletadas 100 g de sedimento para contagem de bactérias heterotróficas, à profundidade de 40 cm da superfície. 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.

Os micro-organismos isolados a partir das amostras de sedimento estão depositados na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Destes, o isolado pré-selecionado foi submetido

às etapas de identificação microbiológica e avaliação quanto a produção de compostos bioativos.

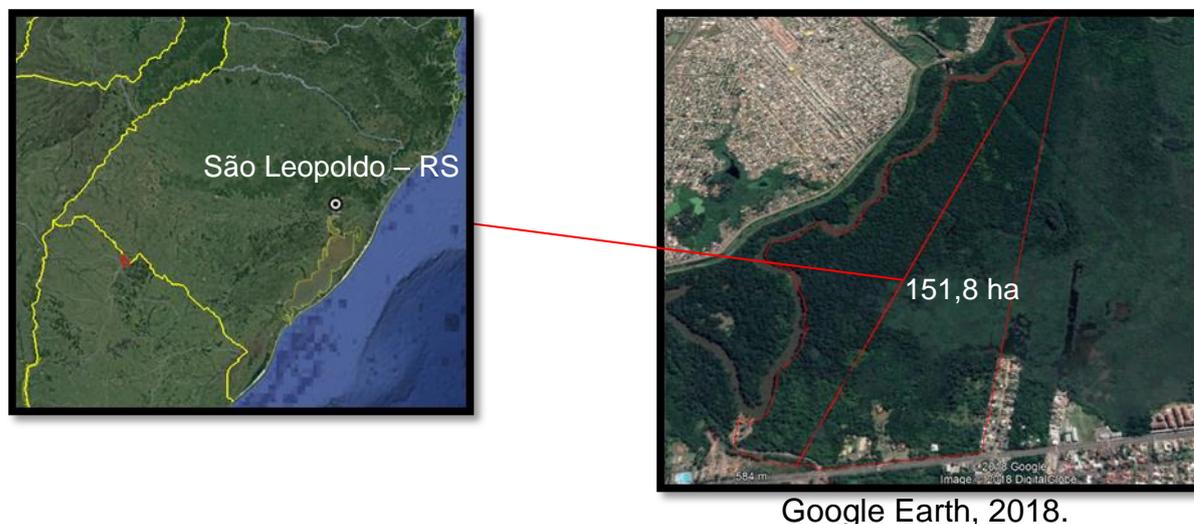


Figura 1 – Localização da Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, situada no município de São Leopoldo/RS

4.1.1.1 Identificação do isolado bacteriano por espectrometria de massas

A partir do crescimento em ágar triptona de soja (TSA), uma colônia do isolado foi inoculada em tubo *Eppendorf*, com 300 μL de água ultrapura e homogeneizado. Em seguida, foi adicionado 900 μL de etanol absoluto e centrifugado a velocidade de 18500g, durante 2 minutos. O excesso de líquido foi removido e foram adicionados 50 μL de ácido fórmico 70%. A amostra foi novamente homogeneizada e adicionados 50 μL de acetonitrila. Em seguida centrifugou-se durante 2 minutos à velocidade 18500g. Um μL de sobrenadante foi aplicado a um spot da placa de aço inoxidável e adicionado 1 μL de solução ácido α ciano-4-hidroxicinâmico e após a secagem deste spot, a leitura foi realizada por espectrometria de massas, Maldi Biotyper 4.0, software MBT OC.

4.1.1.1.2 Construção do dendrograma

O dendrograma foi construído a partir dos resultados de identificação por espectrometria de massas. Para construção do dendrograma, foi utilizado o MALDI Biotyper 4.0, que permite a análise de conjuntos de espectros, através da Análise de Componentes Principais (PCA). A análise estatística fornece informações sobre a hetero/homogeneidade de um conjunto de dados. A Análise de Componentes

Principais é gerenciada por uma ferramenta de software externa do MATLAB integrado no MALDI Biotyper.

4.1.1.2 Identificação do isolado bacteriano via sequenciamento do gene 16S rRNA

Foi realizada a extração de DNA, seguido da amplificação e sequenciamento de bases do isolado bacteriano 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 FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R530 (5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3') (GONTANG et al., 2007). 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 ultrapura 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/>).

A construção da análise da árvore filogenética foi realizada usando o software MEGA X.

4.1.2 Micro-organismos indicadores

Os micro-organismos indicadores para a avaliação da atividade antimicrobiana foram espécies de coleções mantidas no laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Algumas linhagens foram oriundas de amostras de alimentos e cepas ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, USA), bem como micro-organismos de importância clínica isolados na rotina de um Laboratório de Análises Clínicas de Porto Alegre.

Os isolados foram conservados congelados em caldo TSB suplementado com glicerol 20%, a -20 °C. Todos os micro-organismos foram reativados em TSA a 35 ± 2 °C. Alguns isolados, exigentes de cultivos especiais, foram recuperados conforme manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005).

Os micro-organismos testados como indicadores foram divididos em grupos. O primeiro compreende isolados de amostras clínicas, seguido por isolados provenientes de alimentos e cepas padrão, como descritos na tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Micro-organismos indicadores para avaliação da atividade antimicrobiana

Micro-organismo indicador	Resistência	Origem
Micro-organismos isolados de amostras clínicas		
<i>Escherichia coli</i> S1	-	Urina
<i>Escherichia coli</i> S2	-	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S3	-	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S4	-	Urina
<i>Enterobacter cloacae</i> S5	-	Urina
<i>Enterobacter aerogenes</i> S6	-	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S7	-	Secreção traqueal
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S8	-	Secreção traqueal
<i>Acinetobacter baumannii</i> S9	-	Swab anal
<i>Acinetobacter baumannii</i> S10	-	Urina
<i>Staphylococcus aureus</i> S11	-	Abcesso epidural
<i>Staphylococcus aureus</i> S12	-	Hemocultura
<i>Staphylococcus aureus</i> S13	-	Secreção lombar
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> S14	-	Urina
<i>Staphylococcus epidermidis</i> S15	-	Urina
<i>Staphylococcus capitis</i> S16	-	Hemocultura
<i>Enterococcus faecalis</i> S17	-	Cateter vesical
<i>Enterococcus faecalis</i> S18	-	Urina
<i>Enterococcus faecalis</i> S19	-	Urina
<i>Enterococcus faecium</i> S20	-	Urina
<i>Escherichia coli</i> R1	KPC	Swab retal
<i>Escherichia coli</i> R2	AmpC	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i> R3	KPC	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i> R4	KPC	Swab de pele
<i>Enterobacter cloacae</i> R5	NDM	Swab retal
<i>Enterobacter aerogenes</i> R6	KPC	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R7	Resistente a carbapenêmicos	Hemocultura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R8	Resistente a carbapenêmicos	Urina
<i>Acinetobacter baumannii</i> R9	NDM	Urina
<i>Acinetobacter baumannii</i> R10	KPC	Swab retal
<i>Staphylococcus aureus</i> R11	Mrsa	Swab nasal
<i>Staphylococcus aureus</i> R12	Mrsa	Abcesso mamário
<i>Staphylococcus aureus</i> R13	Mrsa	Secreção quadril direito
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> R14	Oxacilina Resistente	Urina
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> R15	Oxacilina Resistente	Hemocultura
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> R16	Oxacilina Resistente	Hemocultura
<i>Enterococcus faecalis</i> R17	VRE	Swab retal

<i>Enterococcus faecalis</i> R18	VRE	Urina
<i>Enterococcus faecalis</i> R19	VRE	Urina
<i>Enterococcus faecium</i> R20	VRE	Hemocultura
Isolados de Alimentos		
<i>Listeria monocytogenes</i> 4C	-	Banco de isolados ICTA
<i>Listeria monocytogenes</i> 17D78/03	-	Banco de isolados ICTA
<i>Listeria monocytogenes</i> 4B carcaça	-	Banco de isolados ICTA
<i>Listeria innocua</i> 6B	-	Banco de isolados ICTA
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> BQ Oxford - 1	-	Bancada quaijo – Zaffari
<i>Listeria seeiligeri</i> BP Palcan – 2	-	Bancada Presunto – Zaffari
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> PF Oxford - 3	-	Presunto fatiado – Zaffari
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> MP Oxford - 4	-	Mãos presunto – Zaffari
<i>Listeria seeligeri</i> ou <i>innocua</i> BP Oxford - 5	-	Bancada presunto – Zaffari
<i>Listeria monocytogenes</i> QF Oxford - 6	-	Queijo fatiado – Zaffari
Cepa American Type Culture Collection (ATCC)		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603		
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 43861		
<i>Corynebacterium fimi</i> Nctc 7547		
<i>Corynebacterium striatum</i> ATTCC BAA 1293		
<i>Listeria innocua</i> (CT) 00354 ATCC 33090		
<i>Listeria ivanovii</i> 00355 ATCC 19119		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7466		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29223		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35954		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		

4.2 Curva de crescimento e produção da substância antimicrobiana pelo isolado bacteriano

O crescimento celular e a produção da atividade antimicrobiana pelo isolado produtor selecionado foram avaliados a partir do cultivo em caldo TSB. Uma alíquota de 1% do pré-inóculo da cultura, foi inoculada em Erlenmeyer contendo 100 mL de TSB e incubado a 30 °C por 48 horas em incubadora com agitação orbital a 50 rotações por minuto (rpm). Durante o período de incubação, alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo regulares e avaliadas quanto o crescimento celular da bactéria, sua atividade antimicrobiana e variação de pH. O momento da inoculação no meio de cultivo foi considerado o tempo zero das análises.

A determinação do crescimento bacteriano foi realizada como descrito por Milles & Misra (1938) com modificações. Alíquotas de 100 µL do cultivo bacteriano foram coletadas e diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} em microtubos estéreis de 1,5 mL, contendo 900 µL de salina 0,85%. Após homogeneização, foram aplicados de cada diluição 20 µL em placas com ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e procedeu-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nas diluições com número de no mínimo 10 e máximo 100 colônias bacterianas. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de diluição seriada para a determinação das Unidades Arbitrárias por mililitros (UA/mL). A atividade antimicrobiana foi definida pela última diluição que apresentou zona de inibição em Ágar Mueller Hinton. Suspensões da cultura indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foram preparadas em solução salina com turvação correspondendo à escala 0.5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e espalhadas com suabe em placas com ágar Mueller Hinton. Foram aplicados diretamente no meio de cultura 20 µL da fração parcialmente purificada. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas (MAYR-HARTING et al., 1972).

4.3 Purificação parcial do sobrenadante bruto da bactéria

4.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A partir do cultivo do sobrenadante bruto preparado em 300 mL, foi realizada a precipitação fracionada para definir a faixa de saturação ideal. A precipitação fracionada foi realizada nos seguintes intervalos: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% de saturação. O experimento foi conduzido sob condições de refrigeração em banho de gelo e agitação. A quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir esta faixa de saturação foi calculada com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação, segundo Scopes (1994). Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para a etapa de precipitação, a suspensão formada foi mantida por 30 minutos sob agitação. Após, esta suspensão foi centrifugada a 4 °C (10.000 g por 15 min), o pellet foi separado do sobrenadante e ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. O sobrenadante foi recolocado em banho de gelo e em seguida, foi adicionada nova quantidade de sulfato de amônio para atingir a próxima faixa de saturação. Em todos

os intervalos de saturação, verificou-se a atividade antimicrobiana conforme Motta & Brandelli (2002), com modificações, a fim de determinar a faixa de saturação ideal. A bactéria indicadora utilizada foi *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

4.3.2 Cromatografia líquida de gel filtração

Após determinação da melhor faixa de saturação para a precipitação com sulfato de amônio, o pellet resultante da etapa anterior foi ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, e aplicado em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-200). A coluna (30 x 0,8 cm), foi eluída também com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, sendo coletadas 30 frações de 1 mL cada. As alíquotas foram tratadas termicamente (95 °C/12 min) para eliminação de células bacterianas. Para cada fração foram realizados testes para atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 de acordo com o item 4.6, e estimada a concentração de proteínas através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (280 nm).

4.3.3 Membrana de Ultrafiltração

As frações com atividade antimicrobiana, resultantes da etapa anterior, foram fracionadas por ultrafiltração utilizando o sistema de ultrafiltração do tipo Amicon Ultra 0.5, com membrana de retenção de 50 kDa. Foram adicionados 500 µL da fração com atividade antimicrobiana obtida através da Cromatografia líquida de Gel filtração ao filtro, que foram submetidos à centrifugação (18500 g por 30 minutos). Após centrifugação o conteúdo retido do filtro foi centrifugado a 10.000 g por 2 minutos à 4 °C. As frações retida e filtrada foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana frente à cultura indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

4.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis

Para determinar o conteúdo de proteína solúvel de cada etapa de purificação utilizou-se o método descrito por Lowry et al (1951), com o emprego de reagente de Folin-Ciocalteu. A concentração de proteína foi determinada através da comparação com uma curva-padrão (figura 2) preparada com albumina sérica bovina e a absorbância foi medida a 750 nm. Para calcular a concentração de proteínas (mg/mL) presentes nas amostras, utilizou-se a equação da reta obtida

referente a curva de calibração ($y=0,0415x+0,0408$). O valor de R^2 foi 0,9862. O experimento foi realizado em duplicata.

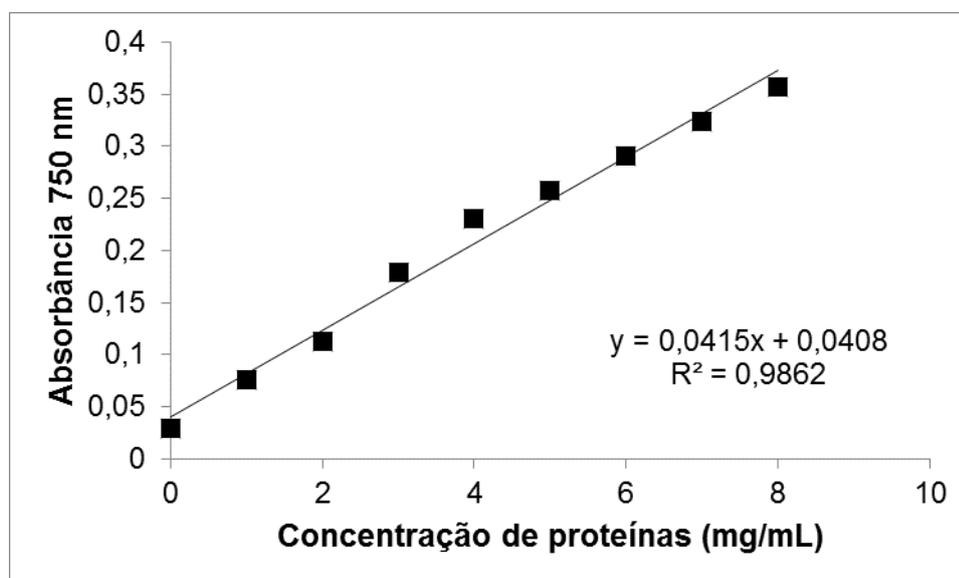


Figura 2 - Projeção da curva-padrão de albumina sérica bovina para determinação da concentração de proteínas solúveis

4.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O grau de purificação e o perfil proteico de cada etapa de purificação foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Para a avaliação, 20 μ L das etapas de purificação, sobrenadante bruto (8,94 mg/mL), Precipitado (6,87 mg/mL) e fração Sephadex (1,56 mg/mL), foram ressuspensos em 25 μ L de tampão de amostra. Esta ressuspensão foi incubada a 100 °C por 5 minutos e, a seguir, aplicada em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS). A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (150 V e 25 mA). Após a eletroforese, o gel destinado a avaliação da atividade antimicrobiana foi lavado com água destilada por diversas vezes para a remoção do SDS e posteriormente aplicado em uma placa de ágar TSA. Sobre a placa foi vertido ágar TSA semi-sólido contendo aproximadamente 10^5 UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e incubada por 24 e 48 horas a 30 °C. Para a observação de bandas de proteínas, outro gel foi corado com nitrato de prata (0,2% AgNO_3 , 0,008% formaldeído) (HEUKESHOVEN & DERNICK, 1985). No gel também foi aplicado o marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), que apresenta proteínas na faixa de 10 a 220 kDa.

4.6 Determinação do espectro de ação

O espectro de ação da substância antimicrobiana estudada foi determinado a partir das frações provenientes da cromatografia líquida de gel filtração termicamente tratadas frente a micro-organismos de importância clínica e alimentar (descritos no item 4.1.2). Suspensões das culturas indicadoras foram preparadas em solução salina com turvação correspondendo à escala 0.5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e espalhadas com suabe em placas com ágar Mueller Hinton. Foram aplicados 20 μ L destas frações parcialmente purificadas em duplicatas. As placas foram incubadas por 24 horas a temperatura ótima de cada micro-organismo. A atividade antimicrobiana foi determinada pela medição dos halos de inibição (mm) formados durante o crescimento dos micro-organismos.

4.7 Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado

As frações resultantes da Cromatografia líquida de gel filtração que apresentaram atividade antimicrobiana foram unidas e caracterizadas quanto à estabilidade térmica, estabilidade frente a enzimas proteolíticas, solventes orgânicos e detergentes. Ao final de cada tratamento, as amostras foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana frente à bactéria indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (MOTTA & BRANDELLI, 2002). Para o controle dos testes de caracterização, uma alíquota da fração sem tratamento foi utilizada em cada caso, a fim de calcular a atividade antimicrobiana residual após cada teste realizado. A fórmula para calcular a atividade residual (AR) está representada pela Equação 1:

EQUAÇÃO 1

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

Sendo:

Ht: halo do sobrenadante após tratamento (mm)

Hc: Halo do controle (mm)

A.R.: atividade residual

4.7.1 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica do sobrenadante bruto parcialmente purificado foi avaliada incubando-se alíquota de 1000 μ L da fração parcialmente purificada a 100

°C, em banho seco, durante 3, 5 e 10 minutos. Alíquotas também foram expostas a 121 °C/105 kPa por 15 minutos (em autoclave). Para a avaliação da manutenção da fração a baixas temperaturas, foram refrigeradas alíquotas a 4 °C por 10, 20 e 30 dias e congeladas a -20 °C por 15 dias (MOTTA et al., 2007).

4.7.2 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

Amostras de 1 mL do sobrenadante bruto parcialmente purificado foram incubadas a 37 °C por 60 minutos com concentração final de 2 mg/mL com as enzimas Tripsina suína (SAFC Biosciences, Kansas, USA) e Papaína (VETEC Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, BR). Após este período, estas amostras foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos para a inativação das enzimas. Para controle, as proteases foram testadas sem adição da substância antimicrobiana, diluídas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7, e tratadas termicamente a 100 °C por 3 minutos. A substância antimicrobiana foi testada com e sem o tratamento térmico, além do controle da enzima (MOTTA et al., 2007).

4.7.3 Estabilidade frente a solventes orgânicos e detergentes

A estabilidade da atividade antimicrobiana frente a solventes orgânicos e detergentes foi avaliada. Para isto, alíquotas com 50 µL da substância parcialmente purificada foram adicionadas a 25 µL de cada solvente orgânico e detergente. Após homogeneização, as alíquotas foram incubadas por 60 minutos a 37 °C. Os solventes empregados foram: Acetona, Metanol, Etanol, Clorofórmio, Xileno, Dimetilsulfóxido (DMSO), Butanol e Éter etílico a concentração final de 50% (v/v). Os detergentes utilizados foram Tween 20 e Tween 80 em uma concentração final de 10% (v/v) (MOTTA et al., 2007).

4.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como médias e desvio padrão de três repetições. As diferenças foram consideradas significativas em um nível de confiança de 95% usando o Teste de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação do micro-organismo produtor

5.1.1 Identificação do micro-organismo produtor via MALDI-TOF/MS

Em relação à análise por Maldi-Tof/MS, os escores previstos são: 0,000 - 1.699 indicando 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. De acordo com os escores apresentados, valores até 1,9 sugerem identificação provável em nível de gênero, embora valores menores do escore não garantam a identificação segura no nível de espécie bacteriana para o isolado, as espécies sugeridas pelo MALDI-TOF/MS foram *Bacillus altitudinis* com escore de 2,048 seguido de 1,986, e *Bacillus pumilus*, com escore de 1,641.

5.1.1.1 Análise do dendrograma

Considerando a análise do dendrograma (Figura 3), cujas linhas estão dispostas segundo os níveis de similaridade da expressão fenotípica das proteínas presentes nos isolados, a comparação entre os isolados de *Bacillus* foi realizada entre *Bacillus* sp. sed 1.4 e *Bacillus* presente no banco de dados do MALDI TOF. De acordo com a figura abaixo, podemos sugerir que o isolado *Bacillus* sp. sed 1.4 está mais próximo de *Bacillus altitudinis*, com um nível de distância próximo de 100, e um pouco mais distante de *Bacillus pumilus*, com a distância um pouco maior que 100, mas ambas bactérias compartilham um ancestral comum.

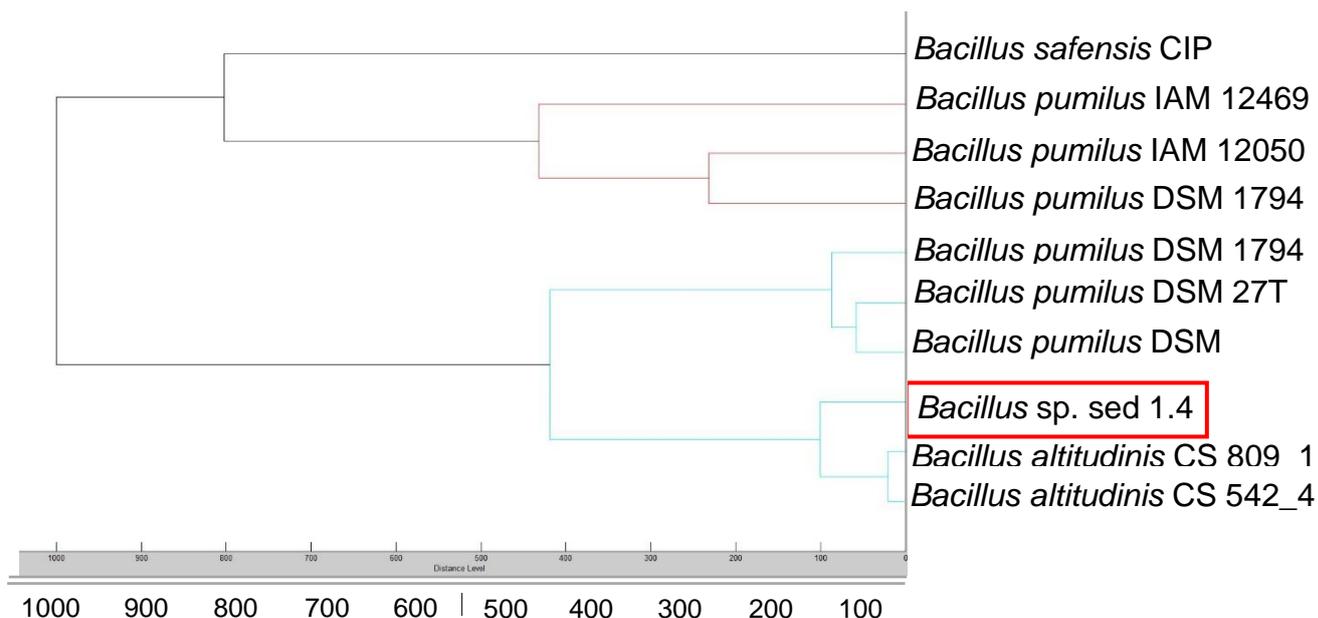


Figura 3 – Dendrograma das espécies de *Bacillus* demonstrando os níveis de similaridade da expressão fenotípica das proteínas presentes nos isolados.

5.1.2 Identificação do micro-organismo produtor via sequenciamento do gene 16S rRNA

A análise comparativa da sequência do gene 16S rRNA que a bactéria apresentou 100% de similaridade com *Bacillus altitudinis* e *Bacillus pumilus* e a sequência foi submetida ao Standard Nucleotide BLAST com o código de acesso MH666076 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A árvore filogenética foi construída usando o método de união vizinha. A sequência de 16S rRNA foi comparada com sequências semelhantes ao micro-organismo referência por meio do NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) com as sequências das seguintes estirpes, obtidas no GenBank: *Bacillus pumilus* WAPB4 DQ355508 (Aunpad, R., & Na-Bangchang, K., 2007), *Bacillus altitudinis* D70MK720001, *Bacillus altitudinis* D164MK720011, *Bacillus pumilus* SAFR-032, *Bacillus pumilus* WAPB4DQ355508, *Bacillus pumilus* cepa ATCC 7061NR_043242.

Bacillus sp. sed 1.4 teve similaridade de 75% com *Bacillus altitudinis* KJ020347 e *Bacillus pumilus* NR043242 e 97% com *Bacillus sp. sed 2.2* MH666075.

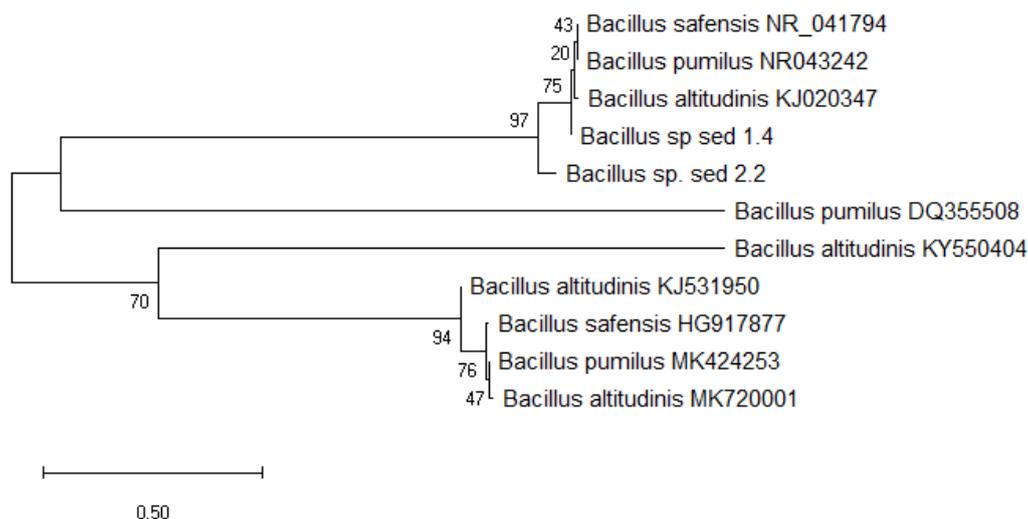


Figura 4 – Árvore filogenética obtida a partir do gene rRNA 16S das sequências com melhor similaridade sugeridas no BLAST e isolados identificados de outros sedimentos estudados.

5.2 Curva de crescimento do *Bacillus sp. sed 1.4* e produção da substância antimicrobiana

O *Bacillus sp. sed 1.4* foi incubado aerobicamente por 48 horas em caldo TSB a 30 °C, sob agitação orbital a 50 rpm. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente à bactéria indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e foi inicialmente observada na fase de crescimento exponencial, a partir de 9 horas de cultivo. A atividade máxima foi observada na fase estacionária, entre 12 e 30 horas (Figura 5), com 200 UA/mL e o pH manteve-se constante (7,0) durante todo o período de incubação. A atividade antimicrobiana apresentou um declínio a partir de 33 horas de incubação para 100 UA/mL. A partir desse resultado o sobrenadante bruto com 24 horas de cultivo foi obtido para então proceder-se com as demais etapas de purificação.

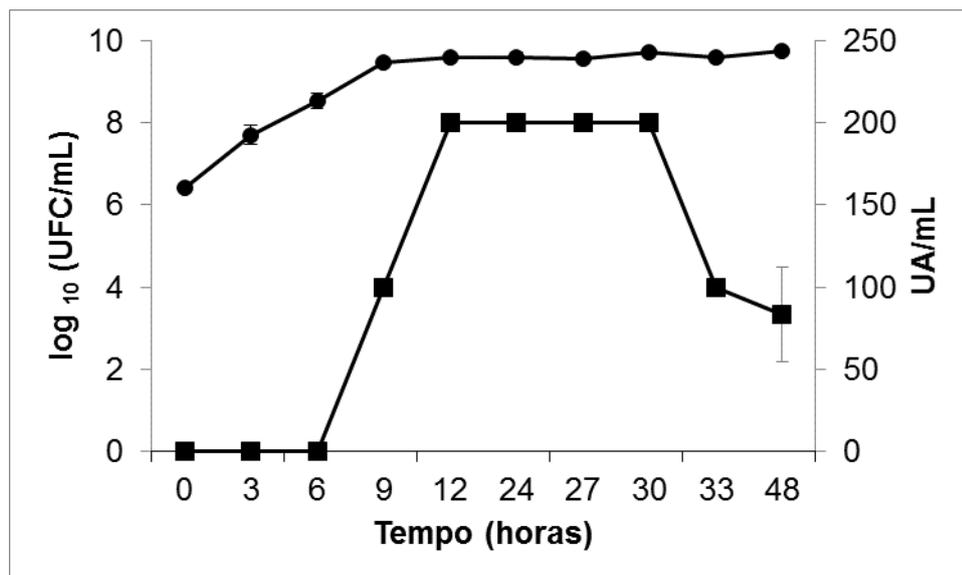


Figura 5 - Curva de crescimento do isolado *Bacillus* sp. sed 1.4. O crescimento (•) e atividade antibacteriana (■) foram monitorados durante o crescimento em TSB a 30 °C. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A cepa indicadora foi *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3).

5.3 Purificação parcial da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus* sp. sed 1.4

5.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi realizada em três repetições a partir de 299 mL do sobrenadante bruto obtido em 24 horas de cultivo do isolado. A partir da Figura 6, foi possível observar que a maior concentração da atividade antimicrobiana está na faixa de saturação de 40-60% com 3200 UA/mL e observa-se menor atividade nas faixas de saturação de 0-20% e de 20-40%, além do extrato bruto, quando testada frente à cepa indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

A quantidade de sulfato de amônio adicionada para atingir a próxima faixa de saturação foi adicionada ao sobrenadante da etapa anterior. Devido a esta metodologia, as faixas de saturação foram agrupadas (0 a 60%), atingindo assim, a atividade antimicrobiana de 3200 UA/mL.

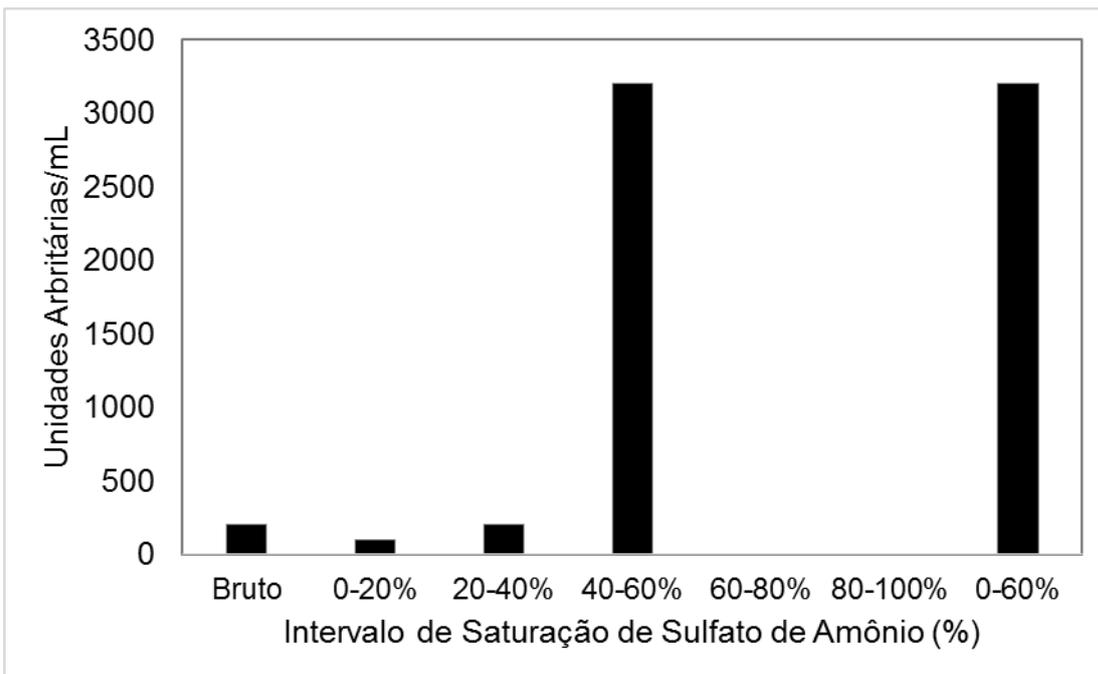


Figura 6 – Atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto de *Bacillus* sp. sed 1.4, nas diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio avaliado frente a cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

5.3.2 Cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-200)

A figura 7 ilustra o perfil de eluição do *pellet* resultante da precipitação com sulfato de amônio na faixa de saturação 0-60%, ressuspendido com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0, e aplicado na coluna de cromatografia líquida de gel filtração, utilizando a resina Sephadex G-200. Foram realizadas três repetições. A amostra foi eluída também com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0. As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram 8 e 9 com 100 UA/mL para cada uma das frações. A absorbância 280 nm variou entre 1,167 e 1,121 nm para as frações 8 e 9, respectivamente. O segundo pico de absorbância apresentado de absorbância é provavelmente referente à presença de outras proteínas presentes no meio de cultura e proteínas provenientes da estrutura e atividades metabólicas do isolado produtor.

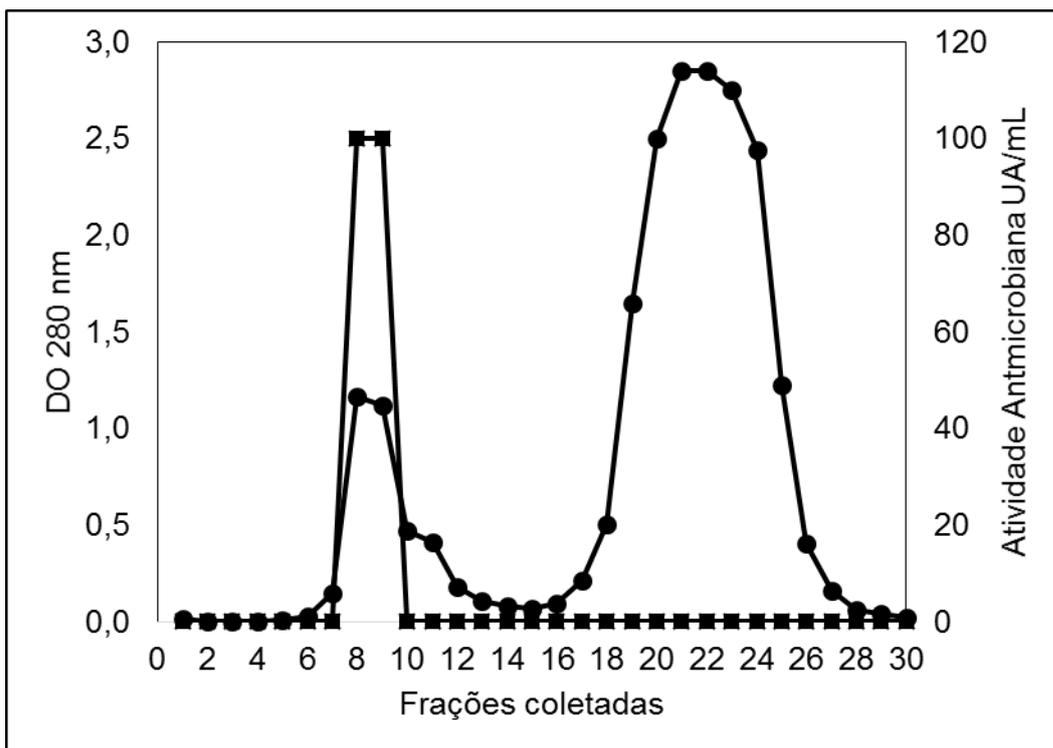


Figura 7 – Perfil de eluição do sobrenadante bruto produzido por *Bacillus* sp. sed 1.4 precipitado (0-60%) em coluna de gel filtração Sephadex G-200. A absorvância (•) e a atividade antimicrobiana (■) foram determinadas para cada fração coletada.

5.3.3 Membrana de ultrafiltração

As frações com atividade antimicrobiana resultante da cromatografia líquida de gel filtração foram unidas e submetidas à ultrafiltração, utilizando membranas de corte com peso molecular de 50 kDa. Foram obtidas duas frações, retida e filtrada. A atividade antimicrobiana inicial era equivalente a 100 UA/mL. Nesta etapa de purificação, a atividade foi observada na fração retida, com halos de inibição de 12 mm em média, e manteve a atividade antimicrobiana de 100 UA/mL, enquanto que a fração filtrada não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana contra a cepa indicadora *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Este resultado indica que a fração contém peptídeos com peso molecular acima de 50 kDa.

5.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis

As frações resultantes de cada etapa de purificação parcial, incluindo o sobrenadante bruto, foram avaliadas através do método Lowry para determinação da concentração de proteína. De acordo com a tabela 2, observou-se que a substância antimicrobiana apresentou 22,37 UA/mg na atividade específica do sobrenadante bruto, enquanto que nas frações obtidas durante a cromatografia de

gel filtração em coluna G-200 apresentou 769,23 UA/mg, com rendimento final foi de 2%.

Tabela 2 – Concentração de proteínas solúveis das frações resultantes das etapas de purificação produzido por *Bacillus* sp. sed 1.4.

Fração	A	Vol	AT	TProt	A.E.	F.P.	Y
Bruto	200	299	59.800	8,94	22,37	1	100
PPT	3200	6	19200	6,87	465,79	17,2	32,1
Sephadex	100	12	1200	1,56	769,23	32,9	2,0

PPT- após precipitação de 40-60%, A, Atividade (UA/mL); Vol, Volume (mL); AT, Atividade total (UA); Tprot, Total de proteína (mg/mL); A. E., Atividade específica (UA/mg); F.P., Fator de purificação; Y, Rendimento (%)

5.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil proteico das frações do sobrenadante bruto, do precipitado na faixa de 0-60% e da substância antimicrobiana parcialmente purificada, resultante da cromatografia líquida, foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 8). A seta indica a banda principal das frações eluídas na G-200 com peso molecular de aproximadamente 148 kDa. No gel destinado à atividade antimicrobina, não foi possível visualizar áreas de inibição correspondentes a bandas de proteínas.

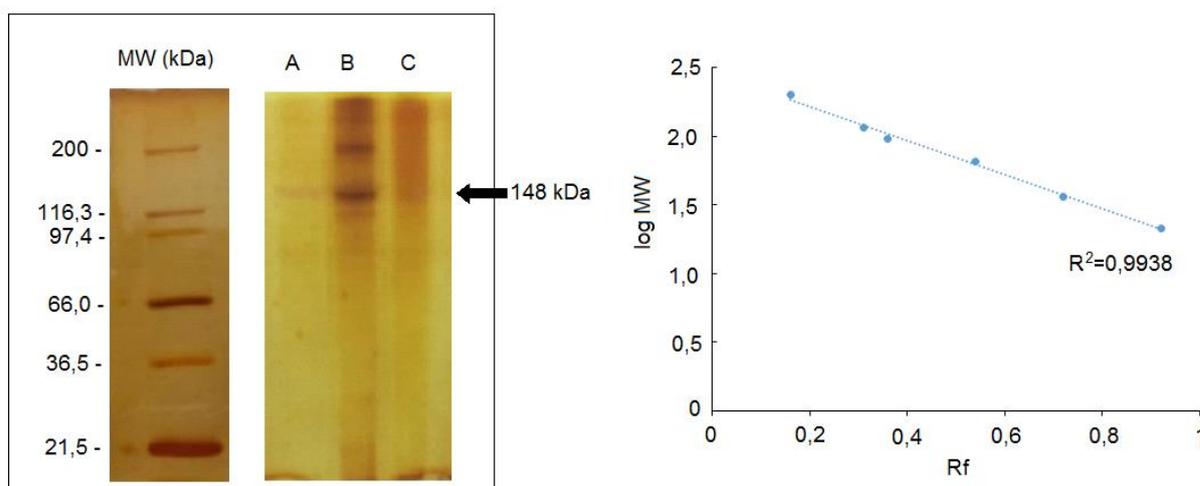


Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata apresentando as bandas de proteínas das etapas de purificação parcial da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus* sp. sed 1.4. A: G-200, B: precipitado na faixa de 0-60%, C: sobrenadante bruto, MW: marcador molecular.

5.6 Caracterização da substância antimicrobiana parcialmente purificada produzida por *Bacillus* sp. sed 1.4

5.6.1 Estabilidade térmica da substância antimicrobiana

A estabilidade térmica da substância antimicrobiana parcialmente purificada, obtida pela cromatografia líquida de gel filtração (G-200) foi observada em diferentes tempos e temperaturas, e os valores da atividade residual foram determinados. Os ensaios foram realizados em duplicata, em três repetições.

A atividade antimicrobiana foi mantida em 100% quando tratada a 100 °C por até 5 minutos e perdida totalmente após exposição por 10 minutos, na mesma temperatura, e autoclavagem (121 °C /15 min). Quando refrigerada a 4 °C, manteve a atividade antimicrobiana por 10 dias e congelada a -20 °C por 30 dias (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade residual da substância antimicrobiana do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido por *Bacillus* sp. sed 1.4 após tratamento térmico

Tratamento	Atividade residual (%)
100 °C/3 min	100
100 °C/5 min	100
100 °C/10 min	0
121 °C/15 min (autoclave)	0
4 °C/10 dias	100
4 °C/20 dias	0
4 °C/30 dias	0
-20 °C/10 dias	100
-20 °C/20 dias	100
-20 °C/30 dias	100

5.6.2 Estabilidade da substância antimicrobiana frente a enzimas proteolíticas

O sobrenadante bruto parcialmente purificado resultante da cromatografia líquida em Sephadex G-200 e com atividade antimicrobiana inicial de 100 UA/mL, foi testado frente às enzimas proteolíticas papaína e tripsina a fim de se avaliar a sua suscetibilidade. As frações empregadas nesse teste foram inativadas quando tratadas com as enzimas na concentração final de 2 mg/mL, sugerindo que a substância antimicrobiana produzida pelo *Bacillus* sp. sed 1.4 seja de natureza proteica.

5.6.3 Estabilidade da substância antimicrobiana frente a solventes orgânicos e detergentes

Solventes orgânicos e detergentes foram testados, duplicatas em três repetições, sobre o sobrenadante bruto parcialmente purificado. Os resultados estão demonstrados na Tabela 4. A atividade antimicrobiana inicial era equivalente a 100 UA/mL e houve perda completa de atividade quando tratada por Tween 80. Quando a estabilidade antimicrobiana foi testada com acetona, a substância antimicrobiana manteve somente 66% de sua atividade residual e acima de 80% quando testada com metanol, etanol, clorofórmio, xileno, éter etílico, dimetil sulfóxido, butanol e Tween 20.

Tabela 4 – Efeito de substâncias químicas na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido por *Bacillus* sp. sed 1.4.

Tratamento	Concentração	Atividade residual (%)	Desvio padrão
Acetona	50% (v/v)	66	4
Metanol	50% (v/v)	100	6
Etanol	50% (v/v)	87,5	2,25
Clorofórmio	50% (v/v)	87,5	0,5
Xileno	50% (v/v)	100	1
DMSO	50% (v/v)	91,66	1
Éter etílico	50% (v/v)	87,5	2,81
Butanol	50% (v/v)	100	6
Tween 20	10% (v/v)	141,66	1
Tween 80	10% (v/v)	0	0

Testes realizados incubando o sobrenadante bruto parcialmente purificado, tratado a 37 °C durante 1 h. Atividade residual foi estimada frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

5.7 Espectro de ação da substância antimicrobiana parcialmente purificada contra isolados provenientes de amostras clínicas e de alimentos

A atividade antimicrobiana da substância parcialmente purificada foi testada contra diversos micro-organismos, entre bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras. Os ensaios foram realizados em duplicatas com três repetições. Os halos de inibição obtidos frente aos micro-organismos indicadores

estão demonstrados na tabela 5. No entanto, não foi observada inibição das bactérias gram-negativas, leveduras e demais gram-positivas.

Tabela 5 – Espectro de ação da substância antimicrobiana parcialmente purificada de acordo com o halo de inibição (mm).

Micro-organismo indicador	Halo de inibição (mm)	Desvio padrão
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	12	0
<i>Listeria monocytogenes</i> 4B carcaça	11	0,57
<i>Listeria innocua</i> L 10 (Leite de búfala)	11	0,57
<i>Listeria monocytogenes</i> QF Oxford (Queijo fatiado)	10	0
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> BQ Oxford (Superfície de bancada)	11	0
<i>Listeria seeligeri</i> BP Palcam – 2 (Superfície de bancada)	13	0
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> PF Oxford (Presunto fatiado)	10	0,57
<i>Listeria welshimeri</i> ou <i>seeligeri</i> MP Oxford (Mãos)	11	0
<i>Listeria seeligeri</i> ou <i>innocua</i> BP Oxford (Superfície de bancada)	12	0

6. DISCUSSÃO

A bactéria produtora da substância antimicrobiana utilizada neste estudo foi isolada de amostras de sedimento provenientes da Unidade de Conservação Imperatriz Leopoldina em São Leopoldo e caracterizada por MALDI-TOF/MS e pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, porém nenhuma das metodologias foram satisfatórias para identificação da bactéria em nível de espécie.

Bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas, em forma de bastonete, formadoras de esporos em condições adversas e podem ser isoladas de ambientes naturais. Até o ano de 2015 o gênero *Bacillus* compreendia mais de 377 espécies (LPSN, 2018).

A sequência 16S rRNA resultante foi alinhada com outras sequências de espécies de *Bacillus* disponíveis no BLAST e a análise mostrou similaridade de 100% com diferentes estirpes de *Bacillus altitudinis* e *Bacillus pumilus*. Embora *B. pumilus* prospere à temperaturas elevadas de até 121 °C por 15 minutos em autoclave e a pulmicina, produzida por esta espécie, ter mostrado atividade antibacteriana contra bactérias clinicamente relevantes, como *S. aureus*,

Enterococcus faecium, VRE e MRSA (AUNPAD & NA-BANGCHANG, 2007), essas características não mostraram-se presentes na linhagem sed 1.4.

A árvore filogenética revelou que *Bacillus* sp. sed 1.4 está relacionado com *Bacillus altitudinis* KJ020347 e *Bacillus pumilus* NR043242 por uma similaridade de 75% e 97% com *Bacillus* sp. sed 2.2 MH666075. Elbanna e colaboradores (2014) relatam que *B. altitudinis* e *B. pumilus* apresentaram 99% de similaridade entre si após terem suas sequências do gene 16S rRNA analisadas, portanto, técnicas como PCR diferencial são propostas pelos autores para a diferenciação destas espécies.

Embora o gene 16S seja bastante utilizado para a identificação de bactérias, esse gene não permitiu a discriminação em nível de espécie, sendo necessário o uso de outros marcadores moleculares, como alternativa às sequências do gene 16S rRNA. Os genes codificadores de proteínas como *rpoB*, *gyrB*, *nifD*, *recA* e *atpD*, apresentam uma melhor alternativa para identificação para as espécies de *Bacillus* (KI et al., 2009; BHANDARI et al., 2013; QUINTERO et al., 2018). Devido à natureza conservada do gene 16S rRNA, a identificação em nível de espécie se torna difícil, pois muitas bactérias do gênero *Bacillus* possuem membros intimamente relacionados, como exemplo temos as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* que possuem sequências do gene 16S muito semelhantes (ELBANNA et al., 2014; STAROSTIN et al., 2015). Nestes casos, o sequenciamento de DNA de certos genes, como o gene *rpoB*, pode fornecer subtipagem de sequenciamento de DNA mais sensível do que o sequenciamento 16S rRNA para espécies bacterianas.

A análise de similaridade dos espectros das amostras, realizada através do dendrograma com dados do MALDI-TOF/MS, demonstrou que a análise de correlação teve distância de 400. A comparação entre *Bacillus* sp. sed 1.4 e espécies de *Bacillus* presentes no banco de dados do MALDI TOF, demonstrou que *Bacillus* sp. sed 1.4 está mais próximo de *Bacillus altitudinis*, com um nível de distância próximo de 100, e um pouco mais distante de *Bacillus pumilus*, com a distância um pouco maior do que 100, porém ambas espécies compartilham um ancestral em comum.

A identificação por MALDI-TOF/MS, de acordo com os escores apresentados, garante a identificação segura somente em nível de gênero. Métodos clássicos de identificação de micro-organismos, como testes bioquímicos e

sequenciamento de DNA, são demorados e trabalhosos, segundo Starostin e colaboradores (2015). Os autores abordam que a espectrometria de massa, MALDI-TOF, é simples e rápida, mesmo que esta metodologia requeira um banco de dados de referência projetado para modelos específicos e seja bastante onerosa. Os autores descrevem uma abordagem para identificação de micro-organismos por espectros de massa para auxiliar na identificação de isolados bacterianos de ambientes extremos, incluindo as espécies do gênero *Bacillus* intimamente relacionadas, como o grupo *Bacillus cereus*. Shu e Yang (2017) avaliaram a influência das condições de cultivo, incluindo tempo de incubação, temperatura e meio de cultura e identificaram fatores que afetam a classificação precisa quando o *Bacillus* é isolado de diferentes origens ambientais e que estas variações têm efeitos consideráveis na classificação de *Bacillus*, exceto a variação do meio de cultura. Os grupos *B. subtilis* e *B. cereus* foram os dois alvos deste estudo. Os autores descrevem que o grupo *B. pumilus* engloba *B. altitudinis*, *B. aerophilus*, *B. safensis*, *B. pumilus* e *B. stratosphericus* que são diferenciados pela sequência *gyrB* (subunidade da DNA-girase), além de características fenotípicas bacterianas e quimiotaxonômicas.

Bacillus sp. sed 1.4 foi avaliado quanto ao seu potencial de produção de compostos antimicrobianos. A atividade antimicrobiana deste composto foi observada já na fase de crescimento exponencial, com 9 horas de cultivo e a atividade máxima na fase estacionária, entre 12 e 30 horas de cultivo com 200 UA/mL, resultados semelhantes foram encontrados por Chalasani e colaboradores (2015) que detectaram o início da produção da substância antimicrobiana também com 9 horas de cultivo pelo micro-organismo *Bacillus* sp., atingindo um máximo de produção com 40h. Boottanun e colaboradores (2017) investigaram a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana secretados por *Bacillus amyloliquefaciens* N2-4 e N3-8 e verificaram que esses metabólitos eram produzidos no início da incubação até a fase estacionária entre 12 e 72 horas. No presente trabalho, houve um declínio da atividade antimicrobiana com 33 horas de cultivo. A atividade de alguns metabólitos secundários e algumas bacteriocinas diminuiu quando a bactéria produtora entra na fase estacionária, devido a adsorção de moléculas pela superfície das células produtoras e degradação proteolítica (KLEEREBEZEM & QUADRI, 2001; GUO et al., 2012).

A substância antimicrobiana produzida pelo *Bacillus* sp. sed 1.4 foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel filtração e membrana de ultrafiltração. A precipitação a 0-60% com sulfato de amônio a partir do sobrenadante de cultura do *Bacillus* sp. sed 1.4 exibiu atividade específica mais elevada, com fator de purificação de 32,9 vezes. Da mesma forma, em tentativas preliminares de precipitação, muitos pesquisadores usaram sulfato de amônio para a precipitação nas etapas de purificação de substâncias antimicrobianas. Boottanun e colaboradores (2017) observaram que a maior atividade antimicrobiana contra as cepas de *B. pseudomallei* foi encontrada quando a precipitação também se deu na faixa de 60% de saturação. Sharma e colaboradores (2018), entre as diferentes concentrações de sulfato de amônio testadas para precipitar o sobrenadante do isolado *Bacillus* sp. PC-3, a concentração inferida foi 60%.

A cromatografia líquida de gel filtração, utilizando a resina Sephadex G-200 do tipo Dextrana, tem faixa de resolução de 5 a 600 kDa, enquanto que a resina Sephadex G-100 tem faixa de 4 a 150 kDa. A faixa de resolução indica os tamanhos de partículas que podem entrar nos poros da resina e serem fracionados. Na membrana de ultrafiltração, o peptídeo apresentou uma massa molecular maior que 50 kDa, peso molecular que está inserido na faixa de exclusão de ambas as resinas Sephadex, porém, a atividade antimicrobiana foi eluída em diferentes frações da G-100, então optou-se pela resina G-200. A atividade antimicrobiana foi eluída no volume morto de uma coluna de exclusão Sephadex G-200, sugerindo um peso molecular maior, entretanto a detecção da atividade antimicrobiana em gel de poliacrilamida não revelou uma banda específica correspondendo ao peptídeo ativo. Essa característica indica que a substância possa ser secretada em forma de agregados, como descrito por Cladera-Olivera e colaboradores (2004), onde *Bacillus licheniformis* P40 produziu uma substância antimicrobiana de aproximadamente 150 kDa quando a amostra foi eluída em Sephadex G-100. Os autores sugerem que a associação de moléculas de bacteriocina em grandes agregados é possivelmente por causa da natureza altamente hidrofóbica dos peptídeos. Uma coluna de interação hidrofóbica seria mais apropriada, pois essa coluna explora a hidrofobicidade das proteínas em um meio aquoso como princípio de separação.

Os resultados obtidos nos processos de purificação chamam atenção pelos valores de fator de purificação e rendimento. Ao final do processo de purificação parcial, a fração foi purificada 32,9 vezes com rendimento de 2% e atividade específica de 769,23 UA/mg.

Bacillus licheniformis P40 produziu uma substância antimicrobiana que quando purificada e caracterizada por Teixeira e colaboradores (2009), resultou em uma purificação de 100 vezes e um rendimento de 0,3%. O sobrenadante de *Aspergillus terreus* de origem marinha foi purificado por precipitação com sulfato de amônio a 65%, seguida de filtração em gel em Sephadex G-100 e cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50, foi purificado 5,16 vezes com rendimento de 12% (Frag et al., 2016).

Os métodos utilizados neste estudo resultaram em um rendimento baixo. A purificação total da substância bioativa poderia facilitar a identificação e determinação da massa molecular do peptídeo estudado. Ebrahimipour e co-autores (2014) e Dimkic e colaboradores (2017) analisaram a substância antimicrobiana de seus respectivos estudos por cromatografia em camada delgada (CCD). Esta metodologia pode auxiliar na identificação do composto antimicrobiano produzido por *Bacillus* sp. sed 1.4. Dimkic e colaboradores (2017) também utilizaram MALDI-TOF/MS, como técnica rápida e eficaz para a identificação de compostos em extratos bacterianos. DEAE Sepharose (troca aniônica) e de FENIL Sepharose (interação hidrofóbica) foram as técnicas utilizadas para purificação da substância em estudo de Koblitz e Pastore (2004).

Neste trabalho, os efeitos de enzimas proteolíticas, estabilidade térmica, solventes orgânicos e detergentes na substância antimicrobiana produzida por *Bacillus* sp. sed 1.4 foram investigados. A substância antimicrobiana foi inativada quando tratada com as enzimas proteolíticas papaína e tripsina na concentração de 2 mg/mL, isso indica que a substância tem natureza de origem proteica e segundo Aunpad e Na-Bangchang (2007) este seria um critério chave para a caracterização de bacteriocinas.

A tripsina é específica para clivar ligações peptídicas contendo resíduos com cadeia lateral que possui carga elétrica positiva, em condições fisiológicas, tais como a arginina e lisina (LOSSO, 2018). A papaína por sua vez hidroliza ligações peptídicas, amidas e ésteres, especialmente em ligações envolvendo aminoácidos

básicos, como leucina e glicina. Outros autores também demonstraram resultados semelhantes, Motta e colaboradores (2007) encontraram sensibilidade a enzimas lipase, tripsina e pronase E, também na concentração final de 2 mg/mL. Lisboa e colaboradores (2006) também verificaram sensibilidade da substância estudada com as enzimas proteolíticas papaína e tripsina.

Quanto a estabilidade térmica o composto se mostrou estável a temperatura de 100 °C por 5 minutos e quando refrigerado foi estável por até 10 dias. Várias espécies de *Bacillus* produzem proteases neutras e alcalinas, o que pode justificar a perda de atividade no decorrer do período de incubação (ANANDHARAJ et al., 2016). Quando congelada, a substância manteve-se estável por 30 dias. As características de termoestabilidade da substância antimicrobiana parcialmente purificada permitem sugerir sua aplicação em produtos pasteurizados e congelados, característica encontrada também na bacteriocina P34 (MOTTA et al., 2007).

Na avaliação dos efeitos das diferentes substâncias químicas e detergentes aplicados sobre o sobrenadante parcialmente purificado, a substância perdeu sua atividade quando tratada por Tween 80 e permaneceu com atividade residual de 66% quando tratada com acetona. Motta e colaboradores (2007), ao tratar com acetona a substância produzida por uma cepa de *Bacillus*, obtiveram 80% de atividade residual e para as substâncias químicas metanol, clorofórmio, dimetil sulfóxido, etanol, e xilol a atividade foi superior a 80%, resultados semelhantes aos encontrados no estudo comparado, com exceção do butanol, enquanto Motta teve 40% de atividade residual, no presente trabalho foram verificados 100% de sua atividade antimicrobiana. Os experimentos envolvendo solventes orgânicos revelaram que a substância antimicrobiana pode ser solúvel em etanol e metanol, sugerindo uma natureza hidrofóbica. A acetona é um solvente apolar, justificando assim a diminuição da atividade residual em 66%.

A substância antimicrobiana purificada parcialmente e caracterizada neste estudo foi testada contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras, incluindo cepas ATCC, isolados clínicos e isolados de importância alimentar. A substância estudada inibiu o crescimento de diferentes espécies de *Listeria*, no entanto, a substância não foi capaz de inibir bactérias gram-negativas, leveduras e os demais gram-positivos testados, demonstrando um espectro de ação mais

restrito. Liu e colaboradores (2015) citam que substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias gram-positivas têm potencial menor de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas. Isto se deve ao fato de que bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa, que funciona como uma barreira permeável para célula, o que dificulta que as bacteriocinas alcancem a membrana citoplasmática (Garcia-Gutierrez et al., 2019).

O espectro de ação apresentado pela substância antimicrobiana parcialmente purificada, se aproxima ao espectro de ação apresentado por bacteriocinas de Classe IIa produzidas por espécies de *Bacillus*. Segundo Bédard e Biron (2018), as bacteriocinas pertencentes a esse grupo também são chamadas de bacteriocinas do tipo pediocina, conhecidas também por sua forte atividade frente a espécies de *Listeria* e por serem estáveis ao calor. As bacteriocinas desta classe apresentam de 35 a 50 resíduos de aminoácidos. Khochamitet et al. (2015) também encontraram atividade antimicrobiana contra cepas de *Listeria monocytogenes*. Embora a doença de origem alimentar associada a *Listeria monocytogenes* não seja tão comum quanto a de outros patógenos de origem alimentar como *Salmonella*, *Campylobacter* ou *Escherichia coli*, a taxa de mortalidade pode ser considerada a mais alta. Aproximadamente 30% dos casos de listeriose invasiva levam à morte, portanto *L. monocytogenes* pode ser considerado um patógeno de importância alimentar e para a saúde pública (VEGOVÁ et al., 2016; GRAY et al., 2018). Frequentemente introduzida no ambiente de processamento por meio de alimentos crus, espécies de *Listeria* podem se aderir a uma variedade de superfícies com algumas cepas persistindo por vários anos e agindo como fonte de contaminação cruzada contínua (COLAGIORGI et al., 2017; GRAY et al., 2018). *L. monocytogenes* é um organismo difícil de erradicar e sua presença ainda ocorre mesmo com os melhores planos de manejo, como limpeza, desinfecção e sanitização do contato com alimentos e superfícies de contato não alimentar, além da manutenção de equipamentos (DREW & CLYDESDALE, 2015).

A descoberta de substâncias antimicrobianas, como peptídeos e bacteriocinas, pode ser considerada em relação a aplicação em terapias médicas e na indústria de alimentos, porém mais estudos são necessários para o melhor entendimento do tema, afim de contribuir com a atual preocupação em relação a

patógenos resistentes a antimicrobianos e micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos.

7. CONCLUSÃO

A bactéria produtora da substância antimicrobiana estudada foi proveniente de um estudo anterior, onde foram realizadas coletas de sedimento de áreas úmidas na Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS. O isolado foi submetido a identificação através de espectrometria de massas e via sequenciamento do gene 16S rRNA. Os métodos para a identificação do isolado não foram efetivos para a caracterização da espécie, o isolado foi então indentificado como *Bacillus* sp. sed 1.4. Outros métodos moleculares são necessários para melhor identificação, como a utilização de outros genes mais específicos para identificação de espécies de *Bacillus*.

A purificação parcial da substância foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração e ultrafiltração. A caracterização foi avaliada frente à estabilidade térmica, sensibilidade frente a enzimas proteolíticas, solventes orgânicos e detergentes. A atividade antimicrobiana foi inativada quando tratada com tripsina e papaína e teve sua atividade mantida quando tratada a 100 °C por 5 minutos, a 4 °C por 10 dias e a -20 °C por 30 dias, características que sugerem que a substância produzida por *Bacillus* sp. sed 1.4 seja termoestável e de natureza protéica.

A atividade específica da substância parcialmente purificada foi de 769,23 UA/mg, o fator de purificação de 32,9 vezes e purificação de 2%. Métodos de purificação total, visando também métodos simples e baratos, além da determinação exata da massa molecular e o sequenciamento de peptídeos, podem melhor caracterizar a substância antimicrobiana produzida por *Bacillus* sp. sed 1.4.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que *Bacillus* sp. sed 1.4 produz uma substância antibacteriana como um metabólito secundário, com efeito sobre espécies de *Listeria* isoladas de alimentos, porém não teve potencial para inibir outros isolados clínicos e de origem alimentar gram-negativos e gram-positivos, além de leveduras.

8. REFERÊNCIAS

- Aires de Souza M. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. Clin Microbiol Infect. 23(6):373-380.
- Alarcón-Lavín MP, Oyarzo C, Escudero C, Cerda-Leal F, Valenzuela F J. 2017. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. Rev Med Chile. 145: 1559-1564.
- Alcantara M, Morais ICL, Mattos C, Souza OCC. 2012. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. Rev Br de Hig e Sanid Animal. 6:1.
- Alkasaby NM, El Sayed Zaki M. 2017. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- β -Lactamases and Extended-Spectrum- β -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. Int J Microbiol. 2017: 3925868.
- Anandharaj M, Sivasankari B, Siddharthan N, Rani RP, Sivakumar S. 2016. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metalloprotease from novel *Bacillus alkalitelluris* TWI3 isolated from tannery waste. Appl Biochem Biotechnol.178: 1666–1686.
- Arslan S, Eyi A, Özdemir F. 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. J Dairy Sci. 94(12):5851-6
- Aunpad R, Na-Bangchang K. 2007. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. Curr Microbiol. 55(4):308-13.
- Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. 2016. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. Crit Rev Food Sci Nutr. 56(5): 817-34.
- Baltz RH. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. 2016. J Ind Microbiol Biotechnol. 43: 343–370.
- Bédard F, Biron E. 2018. Recent Progress in the Chemical Synthesis of Class II and S-Glycosylated Bacteriocins. Front Microbiol. 9:1048.
- Beltran JA, Aguilera-Mendoza L, Brizuela CA. 2018. Optimal selection of molecular descriptors for antimicrobial peptides classification: an evolutionary feature weighting approach. BMC Genomics.19 (7):672.
- Bernat P, Paraszkiwicz K, Siewiera P, Moryl M, Płaza G, Chojniak J. 2016. Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 32:157.
- Bhandari V, Ahmod NZ, Shah HN, Gupta RS. 2013. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular

terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. Int J Syst Evol Microbiol. 63(7):2712-26

Boottanun P, Potisap C, Hurdle JG, Sermswan RW. 2017. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. AMB Express. 7(1):16.

Brandelli A, Daroit DJ, Correa APF. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. Food Res Int. 73:149-161.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Acesso em 02 dez. 2018.

Brito BG, Tagliari KC, Pinheiro AR, Gomes LM, Berbel MM. 2006. Efeito da utilização de cal no controle de *Salmonella* e *Escherichia coli* em cama de criações de frango de corte. Suplemento Revista Brasileira de Ciência Avícola. 8:246.

Brown ED. 2006. Microbiology: antibiotic stops 'ping-pong' match. Nature. 441 (7091):293-4.

Broz P, Ohlson MB, Monack DM. 2012. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. Gut Microbes. 3(2):62-70.

Cebrián R, Arévalo S, Rubiño S, Arias-Santiago S, Rojo M, Montalban-Lopez M, Martínez-Bueno M, Valdivia E, Maqueda M. 2018. Control of *Propionibacterium acnes* by natural antimicrobial substances: Role of the bacteriocin AS-48 and lysozyme. Sci Rep. 8:11766.

Chalasanani AG, Dhanarajan G, Nema S, Sen R, Roy U. 2015. An Antimicrobial Metabolite from *Bacillus* sp.: Significant Activity against Pathogenic Bacteria Including Multidrug-Resistant Clinical Strains. Front Microbiol. 6:1335.

Chambers HF, Basuino L, Hamilton SM, Choo EJ, Moise P. 2016. Daptomycin- β -Lactam Combinations in a Rabbit Model of Daptomycin-Nonsusceptible Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 60(7):3976-9.

Chater KF. Recent advances in understanding *Streptomyces*. 2016. F1000 Research. 5: 2795.

Chen Y, Liu SA, Mou H, Ma Y, Li M, Hu X. 2017. Characterization of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from Marine Sediments. Front Microbiol. 8:871.

Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IHM, Labbé Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter

- F, Luchters SMF, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm.* 1-10.
- Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol.* 38 (4):251-6.
- Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens.* 6:41.
- Conti R, Guimarães DO, Pupo MT. 2012. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Cienc. Cult.* 64:43-47.
- Demain AL. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41(2):185-201.
- Dimkić I, Stanković S, Nišavić M, Petković M, Ristivojević P, Fira D, Berić T. 2017. The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains. *Front Microbiol,* 8:925.
- Drew CA, Clydesdale FM. 2015. New food safety law: effectiveness on the ground. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 55(5):689-700
- Duarte C, Gudiña EJ, Lima CF, Rodrigues LR. 2014. Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. *AMB Express.* 4: 40.
- Ebrahimipour GH, Khosravibabadi Z, Sadeghi H, Aliahmadi A. 2014. Isolation, Partial Purification and Characterization of an Antimicrobial Compound, Produced by *Bacillus atrophaeus*. *Jundishapur J Microbiol.* 7: e11802.
- Elbanna K, Elnaggar S, Bakeer A. 2014. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. *J Phytopathol.* 162: 712–722.
- El-Shouny WA, Ali SS, Sun J, Samy SM, Ali A. 2018. Drug resistance profile and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESβL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. Essential oils and their potential for utilization. *Microb Pathog.* 116: 301-312.
- Ercoli L, Gallina S, Nia Y, Auvray F, Primavilla S, Guidi F, Pierucci B, Graziotti C, Decastelli L, Scuota S. 2017. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathog Dis.* 14 (7):407-413.
- Farag AM, Abd-Elnabey HM, Ibrahim H A H, El-Shenawy M. 2016. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*, Egypt *J Aquat Res.* 42: 185-192.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld A. 2007. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.* XII, Mosby Elsevier, St Louis, Missouri.

Franco BDGM, Landgraf M. 2005. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 182 p.

García-Cobos S, Kock R, Mellmann A, Frenzel J, Friedrich AW, Rossen JWA. 2015. Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. PLoS One. 10 (7): e0134533.

Garcia-Gutierrez E, Mayer M J, Cotter P D, Nabad A. 2019. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. Gut Microbes. 10: 1-21.

Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, Kumar A, Kapila S. 2014. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. Probiotics Antimicrob Proteins. 6(1): 47-58.

Gogoi M, Shreenivas MM, Chakravorty D. 2018. Hoodwinking the Big-Eater to Prosper: The *Salmonella*-Macrophage Paradigm. J Innate Immun. 1-11

Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 73: 3272-3282

Gonzalez GDT, Sigrist R, Paulo BS. 2016. Avanços recentes na manipulação de genes para uma produção de peptídeos não ribossômicos. RVq. 8: 1998-2025.

Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP, Fox EM. 2018. Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. Front Microbiol. 9: 605.

Guo Y, Zhanqiao Y, Jianhua X, Rijun Z. 2012. Identification of a New *Bacillus licheniformis* Strain Producing a Bacteriocin-Like Substance. Int J Microbiol. 50: 452-458.

Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJ. 2016. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones?. Front Microbiol. 7: 788.

Guzmán-Trampe S, Ceapa CD, Manzo-Ruiz M, Sánchez S. 2017. Synthetic biology era: Improving antibiotic's world. Biochem Pharmacol. 134: 99-113

Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, de Silva NR, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleeschauwer B. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. PLoS Med. 12: e1001923.

Heini N, Stephan R, Ehling-Schulz M, Johler S. 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. Int J Food Microbiol. 283: 59-64

Helal HS, Hanora A, Khattab RA, Hamouda H, Zedan H. 2018. Mining of Egypt's Red Sea invertebrates for potential bioactive producers. Biotechnol Lett. 40:1519-1530.

Heukeshoven J, Dernick R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Wiley – VCH. 6:103-112.

Hmidet N, Ben Ayed H, Jacques P, Nasri M. 2017. Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. Biomed Res Int. 5893123.

Hover BM, Kim SH, Katz M, Charlop-Powers Z, Owen J, Ternei M, Maniko J, B. Estrela A, Molina H, Park, Perlin D, F. Brady S. 2018. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. Nat Microbiol. 3(4):415-422.

Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. 2015. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. Clin Microbiol Rev. 28 (3):687-720.

Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int. 2014:827965.

Khochamit N, Siripornadulsil S, Sukon P, Siripornadulsil W. 2015. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiol. Res. 170: 36-50.

Ki JS, Zhang W, Qian PY. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. J Microbiol Methods. 77(1):48-57.

Kim MC, Min-Hyeok C, Jae-Gee R, Gun-Lo W. 2017. Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Fresh Produce and Human Fecal Samples. Foodborne Pathog Dis. 14: 4.

Kleerebezem M, Quadri LE. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. Peptides. 22(10):1579-96.

Koblitz MGB, Pastore GM. 2004. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24(2): 287-292.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680–685.

Le Lay C, Dridi L, Bergeron MG, Ouellette M, Fliss IL. 2016. Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. J Med Microbiol. 65(2):169-75.

Lee MH, Lee J, Nam YD, Lee JS, Seo MJ, Yi SH. 2016. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food. Int J Food Microbiol. 221:12-8.

- Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. 2017. Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* Producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the Same Animal. *Antimicrob Agents Chemother.* 61 2:e01444-16.
- Liu Z, Wang Y, Walsh TR, Liu D, Shen Z, Zhang R, Yin W, Yao H, Li J, Shen J. Plasmid-Mediated Novel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017. 61: 5.
- Liu S, Bao J, Lao X, Zheng H. 2018. Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Sci Rep.* 8: 11189.
- 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.
- Logan LK, Weinstein RA. 2017. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 215: 28-36.
- Lopes R, Cerdeira L, Tavares GS, Ruiz JC, Blom J, Horácio ECA, Mantovani HC, Queiroz MV. 2017. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol.* 33: 185.
- Losso JN. 2008. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(1): 94-118.
- Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Port J Public Health.* 34: 77-84
- Lupo A, Vogt D, Seiffert SN, Endimiani A, Perreten V. 2014. Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *J Food Prot.* 77(11):1976-81.
- Maffioli SI, Zhang Y, Degen D, Carzaniga T, Del Gatto G, Serina S, Monciardini P, Mazzetti C, Guglielame P, Candiani G, Chiriac AI, Facchetti G, Kaltofen P, Sahl HG, Dehò G, Donadio S, Ebricht RH. 2017. Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA polymerase. *Cell.* 169: 1240-1248.e23.
- Mahajan GB, Balachandran L. 2017. Sources of antibiotics: Hot springs. *Biochem Pharmacol.* 134:35-41.
- Manrique Y, Gibis M, Schmidt H, Weiss J. 2016. Antimicrobial efficacy of sequentially applied eugenol against food spoilage micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 121(6):1699-1709
- Martín-Aspas A, Guerrero-Sánchez FM, García-Colchero F, Rodríguez-Roca S, Girón-González JA. 2018. Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infect Drug Resist.* 11:861-872.

- Martínez B, García P, Rodríguez A. 2018. Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 56:1-6.
- Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2017. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol.* 8: 1205.
- Miles AA, Misra SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Int J Hyg Environ Health.* 38(6):732-749
- Moellering RC. 2011. Discovering new antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents.* 37(1): 2-9.
- Mohamad LO, Ma JB, Hatab S, Xu La Guo J, Rasulov BA, Liu YH, Hedlund BP, Li WJ. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Front Microbiol* 9: 924.
- Mohan V, Sen P. 2018. Elucidation of active site dynamics of papain and the effect of encapsulation within cationic and anionic reverse micelles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 200: 202-211
- Motta AS & Brandelli A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol Biochem.* 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(4):367–375
- Motta AS, Lorenzini DM, Brandelli A. 2007. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. *Curr Microbiol.* 54(4):282-6.
- Moura GS, Gebreyes WA, Marques MFS, Stipp DT, Souza FN, Da Costa LB, Oliveira CJB. 2018. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. *J Dairy Sci.* 101(9):7804-7807.
- Nithya V, Prakash M, Halami PM. 2018. Utilization of Industrial Waste for the Production of Bio-Preservative from *Bacillus licheniformis* Me1 and Its Application in Milk and Milk-Based Food Products. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 10(2):228-235.
- Nunes DM, Júnior FJP, Melo JS, De-Oliveira EC, Meneguini VC, Dias F, Weissheimer FL, Dimech GS. 2016. Outbreak of foodborne disease at a mass event of indigenous peoples in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil, in 2013. *Epidemiol Serv Saude.* 25(1):195-202.
- Oliveira MEF, Araújo DG, Oliveira SR. 2017. Resistência de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de hemoculturas de um hospital de emergência. *J Bras Patol Med.* 53(2):87-91.

Owusu-Kwarteng J, Wuni A, Akabanda F, Tano-Debrah K, Jespersen L. 2017. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. BMC Microbiol. 17: 65.

Padoveze MC, Fortaleza CMCB. 2014. Infecções associadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. Rev. Saúde Pública São Paulo. 48(6):995-1001.

Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Pavão SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. 2013. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. J Antimicrob Chemother. 69 (3): 598-602.

Petchiappan A, Chatterji D. 2017. Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega. 2(10):7400-7409.

Quintero M, Velásquez A, Jutinico LM, Jiménez-Vergara E, Blandón LM, Martinez K, Lee HS, Gómez-León J. 2018. Bioprospecting from marine coastal sediments of Colombian Caribbean: screening and study of antimicrobial activity. J Appl Microbiol. 125(3):753-765.

Ramsamy Y, Essack SY, Sartorius B, Patel M, Mlisana KP. 2018. Antibiotic resistance trends of ESKAPE pathogens in Kwazulu-Natal, South Africa: A five-year retrospective analysis. Afr J Lab Med. 7: 887.

Regmi S, Choi YS, Choi YH, Kim YK, Cho SS, Yoo JC, Suh JW. 2017. Antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* CSB138: characterization, killing kinetics, and synergistic potency. Int Microbiol. 20(1):43-53.

Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 197: 1079–1081.

Roschanski N, Fischer J, Falgenhauer L, Pietsch M, Guenther S, Kreienbrock L, Chakraborty T, Pfeifer Y, Guerra B, Roesler UH. 2018. Retrospective Analysis of Bacterial Cultures Sampled in German Chicken-Fattening Farms during the Years 2011-2012 Revealed Additional VIM-1 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and a Serologically Rough *Salmonella enterica* Serovar Infantis. Front Microbiol. 9:538.

Rosner BM, Schielke A, Didelot X, Kops F, Breidenbach J, Willrich N, Götz G, Alter T, Stingl K, Josenhans C, Suerbaum S, Stark K. 2017. A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011-2014. Sci Rep. 7: 5139.

Ryall B, Carrara M, Zlosnik JE, Behrends V, Lee X, Wong Z, Loughheed KE, Williams HD. 2014. The mucoid switch in *Pseudomonas aeruginosa* represses quorum sensing systems and leads to complex changes to stationary phase virulence factor regulation PLoS One. 9: e96166.

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

Santos IAL, Nogueira JMR, Mendonça FCR. 2015. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. RBAC. 47: 5-12.

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: 70-78.

Seal BS, Drider D, Oakley BB, Brüssow H, Bikard D, Rich JO, Miller S, Devillard E, Kwan J, Bertin G, Reeves S, Swift SM, Raicek M, Gay CG. 2018. Microbial-derived products as potential new antimicrobials. Vet Res. 49(1):66.

SEMMAM – Secretaria Municipal de Meio Ambiente. Atlas Socioambiental de São Leopoldo. Rio Grande do Sul, 2012.

Shah AM, Shakeel-U-Rehman, Hussain A, Mushtaq S, Rather MA, Shah A, Ahmad Z, Khan IA, Bhat KA, Hassan QP. 2017. Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas, India. Microb Pathog. 110: 93-99

Sharma N, Gupta A, Gautam N. 2014. Characterization of Bacteriocin like inhibitory substance produced by a new Strain *Brevibacillus borstelensis* AG1 Isolated from 'Marcha'. Braz J Microbiol. 45(3):1007-15

Sharma V, Ayothiraman S, Dhakshinamoorthy V. 2018. Production of highly thermo-tolerant laccase from novel thermophilic bacterium *Bacillus* sp. PC-3 and its application in functionalization of chitosan film. J Biosci Bioeng. 127: 672-678.

Shu LJ, Yang YL. 2017. Bacillus Classification Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry-Effects of Culture. Sci. 7:15546.

SILVA LN, Da Hora GCA, Soares TA, Bojer MS, Ingmero H, Macedo AJ, Trentina DS. 2017. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. Scientific Reports. 7: 2823.

Silver LL. 2017. The Antibiotic Future: Topics in Medicinal Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg.

Son S, Ko S-K, Jang M, Kim JW, Kim GS, Lee JK, Jeon ES, Futamura Y, Ryoo I-J, Lee JS, Oh H, Hong Y-S, Kim BY, Takahashi S, Osada H, Jang JH, Ahn JS. 2016. New Cyclic Lipopeptides of the Iturin Class Produced by Saltern-Derived *Bacillus* sp. KCB14S006. Mar Drugs. 14(4): 72.

Sosio M, Gaspari E, Iorio M, Pessina S, Medema MH, Bernasconi A, Simone M, Maffioli SI, Ebricht RH, Donadio S. 2018. Analysis of the Pseudouridimycin

Biosynthetic Pathway Provides Insights into the Formation of C-nucleoside Antibiotics. *Cell Chem Biol.* 25(5): 540-549.

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

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

Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, Visessangua W. 2010. *Bacillus siamensis* sp. Nov., isolated from salted crab (pookhem) in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(10): 2364-70

Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 34(5):3-10.

Valdés-Stauber N, Scherer S. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.*60 (10):3809-14.

Van der Kolk JH, Endimiani A, Graubner C, Gerber V, Perreten V. 2018. *Acinetobacter* in Veterinary Medicine with emphasis on *A. baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist.* 16:59-71.

Wajid M, Awan AB, Saleemi MK, Weinreich J, Schierack P, Sarwar Y, Ali A. 2018. Multiple Drug Resistance and Virulence Profiling of *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium* and *Enteritidis* from Poultry Farms of Faisalabad, Pakistan. *Microb Drug Resist.* 25(1):133-142

Walsh C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.*1 (1):65-70.

Yan H, Yun J, Ai D, Zhang W, Bai J, Guo J. 2018. Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 and their inhibitory activity against *Trichothecium roseum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 34: 21.

Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 5: 241.

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

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: 10-16

Zhou Z, Meng H, Liu Y, Gu JD, Li M. 2017. Stratified Bacterial and Archaeal Community in Mangrove and Intertidal Wetland Mudflats Revealed by High Throughput 16S rRNA Gene Sequencing. *Front Microbiol.*8:2148.

Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang J, Huang G. 2018. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 117: 781-789