

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de  
*Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo**

Márcia Pagno Lisbôa  
Bióloga – PUCRS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.  
Fevereiro, 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Adriano Brandelli pela paciência, atenção e pela excelente orientação que me foi dada, o meu muito obrigada.

Aos colegas do laboratório 218, pelo auxílio companheirismo e amizade.

Às colegas Lisana, Amanda e Janice pela amizade, além da ajuda e paciência que me dedicaram.

Aos colegas Daniel, Tais e Ana Carolina, pelas risadas, amizade e companheirismo.

Às colegas Rosiele e Ana Paula pela força que me foi dada com as liofilizações no término do meu trabalho.

Ao colega Delmar, pela atenção, ajuda e contribuição no início do meu trabalho.

Ao Prof. Jorge Amoretti Lisbôa pelas dicas e auxílio na interpretação da espectroscopia de infravermelho.

Ao meu namorado pelo incentivo, força e pelas caronas dadas, nos fins de semana, até a UFRGS.

Aos meus irmãos e cunhada: Cléo, Lucas e Cristiane pela paciência, apoio e companhia.

Aos meus pais que foram a base de tudo me dando a melhor educação possível, sempre me incentivando a persistir, além do apoio acadêmico, financeiro e afetivo. Eu lhes agradeço de coração.

**Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de  
*Bacillus amyloliquefaciens* isolado de solo**

Autor: Márcia Pagno Lisbôa

Orientador: Adriano Brandelli

**RESUMO**

Em anos recentes, surgiram numerosos casos de intoxicação alimentar envolvendo patógenos emergentes. Estes casos levaram a um aumento da preocupação com a preservação dos alimentos minimamente processados e com a segurança alimentar. Este fato está induzindo a pesquisa por inibidores para estes patógenos e fatores para prolongar a vida de prateleira de produtos alimentícios. Entre as novas alternativas na preservação está a utilização de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias. No presente trabalho uma bactéria identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 isolada de solos de mata Atlântica de Santa Catarina foi selecionada dentre outros microrganismos e sua capacidade de produzir antimicrobianos foi avaliada. O extrato bruto da cultura do isolado LBM 5006 foi caracterizado, sendo ativo contra importantes bactérias patogênicas e deteriorantes como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, dentre outras. Houve maior produção do antimicrobiano quando a bactéria foi propagada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 37° C durante 48 h. Após concentração, a atividade antimicrobiana resistiu ao tratamento com enzimas proteolíticas. A atividade antimicrobiana foi verificada em pHs ácidos, sendo inibida em pH 9 e 10. O extrato foi purificado por meio de cromatografia de gel filtração e extração com butanol. O teste qualitativo de ninidrina, juntamente com a espectroscopia de infravermelho e ultravioleta, feitos com a substância purificada revelou que o antimicrobiano possui natureza protéica. O antimicrobiano apresentou um efeito bacteriostático contra 10<sup>6</sup> UFC/mL de *Listeria monocytogenes* na concentração de 25 AU/ml.

1/Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (85 p.). Fevereiro de 2006

**Characterization of an antimicrobial peptide produced by a *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil**

Author: Márcia Pagno Lisbôa

Advisor: Adriano Brandelli

**ABSTRACT**

In recent years, an increase in food poisoning cases involving emerging pathogens have been described. These cases have increased the preoccupation with the preservation of minimally processed food products and food safety. This fact is leading the research for inhibitory substances and for factors to extend the shelf-life of food products. Among the new preservation alternatives is the utilization of antimicrobial peptides produced by bacteria. In present work a bacterium identified as *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 isolated from Atlantic Forest soils of Santa Catarina was selected among other microorganisms and its capacity to produce antimicrobials was evaluated. The crude culture supernatant of the strain LBM 5006 was characterized, being active against important pathogenic and spoilage bacteria like *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *E. carotovora*, *E. coli*, among other. Maximum production of antimicrobial activity was observed when the bacteria was propagated in Brain Heart Infusion (BHI) at 37° C for 48 h. After concentration, the antimicrobial activity was resistant to proteolytic enzymes. Antimicrobial activity was verified in acid pHs, but it was lost at pH 9 and 10. The supernatant was purified by gel filtration chromatography and butanol extraction. The qualitative ninhydrin test, together with infrared and ultraviolet spectroscopy of purified substance revealed that the antimicrobial has a peptide moiety. A dose of 25 UA/mL caused a bacteriostatic effect against 10<sup>6</sup> UFC/mL *Listeria monocytogenes*.

1/Master of Science Dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (85 p.). February, 2006.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	V
RELAÇÃO DE TABELAS .....	VII
RELAÇÃO DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Contaminação alimentar.....	4
2.2 Resistência a antibióticos .....	6
2.3 Peptídeos antimicrobianos .....	7
2.3.1 Peptídeos antimicrobianos produzidos ribossomalmente e não ribossomalmente.....	8
2.3.2 Classificação das bacteriocinas.....	9
2.3.3 Bacteriocinas vs. Antibióticos .....	11
2.3.4 Modo de ação dos peptídeos antimicrobianos .....	11
2.3.5 Aplicações industriais.....	13
2.3.6 Purificação .....	15
2.4 O gênero <i>Bacillus</i> .....	16
2.5 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Equipamentos.....	20
3.2 Meios de cultura .....	21
3.3 Reagentes .....	21
3.4 Isolamento do Microrganismo produtor da substância antimicrobiana.....	22
3.4.1 Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica .....	22
3.4.2 Sequenciamento da região ribossomal 16S .....	23
3.5 Microrganismos indicadores .....	23
3.6 Manutenção dos microrganismos.....	24
3.7 Obtenção do extrato bruto .....	27
3.8 Avaliação da produção da substância antimicrobiana em diferentes condições de cultivo .....	28
3.9 Curva de crescimento e produção.....	29
3.9.1 Preparação do pré-inóculo .....	29
3.9.2 Curva de crescimento .....	29
3.10 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro .....	29

3.11	Caracterização inicial do extrato bruto.....	30
3.11.1	Espectro de ação.....	32
3.11.2	Estabilidade térmica .....	32
3.11.3	Ação em diferentes pHs .....	33
3.11.4	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas .....	33
3.12	Purificação.....	34
3.12.1	Cromatografia de gel filtração (G -100).....	34
3.12.2	Extração com solvente orgânico .....	35
3.12.3	Caracterização da substância antimicrobiana purificada .....	36
3.12.3.1	Teste qualitativo de ninidrina .....	36
3.12.3.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	37
3.12.3.3	Espectroscopia de infravermelho .....	38
3.12.3.4	Espectroscopia de ultravioleta .....	38
3.12.3.3	Determinação da concentração de proteína solúvel .....	38
3.13	Curva dose-resposta contra <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1	Seleção do microrganismo produtor .....	40
4.2	Caracterização da linhagem produtora .....	41
4.2.1	Análise morfológica e bioquímica .....	41
4.2.2	Análise filogenética da bactéria LBM 5006.....	43
4.3	Influência das condições de cultivo na produção da substância antimicrobiana.....	45
4.4	Curva de crescimento e produção .....	48
4.5	Caracterização inicial do extrato bruto.....	49
4.5.1	Espectro de ação.....	49
4.5.2	Estabilidade térmica .....	55
4.5.3	Ação em diferentes pHs .....	57
4.5.4	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas .....	59
4.6	Purificação da substância antimicrobiana .....	60
4.6.1	Cromatografia líquida de gel filtração (G-100) .....	60
4.6.2	Extração com solvente orgânico.....	62
4.7	Caracterização da amostra III.....	63
4.7.1	Estabilidade térmica .....	63
4.7.2	Estabilidade frente a enzimas proteolíticas .....	64
4.7.3	Teste qualitativo de ninidrina .....	65
4.7.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	65
4.7.5	Espectroscopia de infravermelho .....	67
4.7.6	Espectroscopia de ultravioleta .....	69
4.8	Curva dose-resposta contra <i>Listeria monocytogenes</i> .....	70
5.	CONCLUSÕES .....	72
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
7.	APÊNDICE .....	84

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento.....	25
<b>TABELA 2:</b> Resultados das provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas do isolado LBM 5006.....	41
<b>TABELA 3:</b> Atividade antimicrobiana em diferentes condições de cultivo (período e temperatura) sendo o isolado LBM 5006 propagado em BHI. ....	46
<b>TABELA 4:</b> Atividade antimicrobiana em diferentes condições de cultivo (meios de cultura) sendo o isolado LBM 5006 incubado a 37°C/48h.....	47
<b>TABELA 5:</b> Espectro de ação do extrato bruto com aplicação de 20µL nos discos correspondendo a 8 UA e 256 UA por disco.....	52
<b>TABELA 6:</b> Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do extrato bruto.....	55
<b>TABELA 7:</b> Tabela de purificação mostrando as frações obtidas nos passos de purificação.....	62
<b>TABELA 8:</b> Estabilidade térmica da amostra III.....	64
<b>TABELA 9:</b> Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> tratada com diferentes concentrações da substância antimicrobiana.....	71

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Árvore topológica sem raiz obtida pela análise das sequências da região ribossomal 16S do DNA das diferentes espécies de <i>Bacillus</i> através do método neighbor-joining.....	44
<b>FIGURA 2:</b> Curva de crescimento da bactéria produtora e produção da substância antimicrobiana.....	48
<b>FIGURA 3:</b> Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana a 100° C durante diferentes intervalos de tempo.....	56
<b>FIGURA 4:</b> Ação da substância antimicrobiana em diferentes valores de pH.....	58
<b>FIGURA 5:</b> Perfil de eluição do extrato bruto liofilizado em coluna de gel filtração G-100.....	61
<b>FIGURA 6:</b> Gel de poliacrilamida 14% das amostras II e III.....	66
<b>FIGURA 7:</b> Espectro de infravermelho da amostra III.....	68
<b>FIGURA 8:</b> Espectro de ultravioleta da amostra III.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

**API:** *Analytical Profile Indexes*

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BHI:** Infusão de cérebro e coração

**BHA:** Ágar de cérebro e coração

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** etilenodiaminotetracético

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**GRAS:** *generaly recognized as safe*

**ICTA:** Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

**LACEN:** Laboratório Central

**LARA:** Laboratório de Referência Animal – Ministério da Agricultura

**MHA:** Ágar Müller Hinton

**MRSA:** Ágar Man Rogosa e Shape

**NB:** Caldo nutriente

**NCTC:** *National Collection of Type Cultures*

**PBS:** solução tampão fosfato salina

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**TRIS:** hidroximetilaminometano

**TSA:** Ágar triptona de soja

**TSB:** Caldo triptona de soja

**TSPA:** *tear-specific prealbumin*

**UA:** unidades arbitrárias

**UFC:** unidades formadoras de colônia

**UFRGS:** universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1. INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse por novas alternativas para a preservação de alimentos, que vem aumentando ainda mais com o surgimento de novos patógenos de origem alimentar, microrganismos deteriorantes e microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos existentes.

Os consumidores dos alimentos estão cada vez mais exigentes, além de dar importância à segurança do alimento buscam qualidade. As técnicas tradicionais de preservação dos alimentos como salga, temperatura, preservação química, acabam alterando as características organolépticas e nutricionais de alguns alimentos, por este motivo a busca por novas técnicas que não modifiquem tanto estas características estão sendo priorizadas.

O interesse por novos agentes antimicrobianos não se restringe somente à área dos alimentos mas, também, à área farmacêutica. O uso indiscriminado de antimicrobianos ocasionou o desenvolvimento de microrganismos resistentes e multiresistentes, gerando uma situação preocupante que alerta para uma busca imediata por solução.

A utilização de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, tais como as bacteriocinas, tem sido sugerida como uma nova alternativa para a

preservação de alimentos, podendo ser uma solução para a resistência aos antimicrobianos convencionais. Estas substâncias produzidas por microrganismos, possuem atividade bactericida ou bacteriostática normalmente contra membros da mesma espécie ou espécies muito relacionadas à linhagem produtora.

O solo possui uma biodiversidade de microrganismos muito grande. Estima-se que em 1 g de solo contenha entre 20 a 40 mil espécies bacterianas. Devido a essa grande diversidade microbiana, a competição dentro desse ecossistema é muito grande, sendo assim a produção de substâncias antimicrobianas um fator característico dos microrganismos habitantes dos solos.

A espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, que é comum ser isolada de solo, apresenta algumas importantes aplicações industriais, devido a sua elevada capacidade de produção de enzimas. Existem poucos trabalhos descrevendo a produção de peptídeos antimicrobianos por membros da espécie *Bacillus amyloliquefaciens*. Um dos únicos trabalhos existentes relata a atividade antifúngica de uma linhagem pertencente a esta espécie.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antimicrobiano, purificar e caracterizar substância antimicrobiana produzida por bactéria, isolada de solo da Mata Atlântica de Santa Catarina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mais que 20% da biodiversidade do mundo está localizada em florestas brasileiras (Suffredini et al., 2004). De acordo com Giller (1996) dentro dos ecossistemas terrestres, os solos contêm a maior diversidade de organismos e em particular, os microrganismos do solo são altamente diversos. Existem vários trabalhos que evidenciam a grande biodiversidade dos solos terrestres: Borneman & Triplett (1997) mostraram evidências da enorme diversidade microbiana em solos da Amazônia em um estudo filogenético. Gans et al. (2005) demonstraram a abundância de espécies bacterianas e a sua distribuição em solos através de métodos analíticos computacionais e, ainda, Curtis & Sloan (2005) compararam uma tonelada de solo, contendo mais que  $10^{16}$  procariotos, com a nossa galáxia contendo “apenas”  $10^{11}$  estrelas.

Os microrganismos do solo possuem um papel crítico no funcionamento dos ecossistemas, por causa da diversidade dos processos funcionais pelos quais estes organismos são responsáveis, que podem afetar a reprodução de plantas e, assim, afetar a produtividade do ecossistema (Van der Heijden et al., 1998; Klironomos, 2002). Porém, a maioria dos microrganismos, no solo, funcionam como decompositores primários regulando o ciclo de nutrientes,

consequentemente afetando o crescimento e a reprodução das plantas, como foi verificado por Bonkowski & Roy (2005).

A produção de antimicrobianos, como as bacteriocinas, é um fator de proteção utilizado por muitos microrganismos. Assume-se, de uma maneira geral, que as bacteriocinas possuem um importante papel na dinâmica populacional das bactérias no solo e que a resistência a bacteriocinas, ou a produção das mesmas, seja uma importante característica competitiva no solo (Frey et al., 1996). Existem diversas bacteriocinas já caracterizadas produzidas por bactérias isoladas de solo, como a subtilosina A produzida por *Bacillus subtilis* (Thennarasu et al., 2005), a cereína 8A produzida por *Bacillus cereus* (Bizani et al., 2005), a durancina L28-1A produzida por *Enterococcus durans* L28-1 (Yanagida et al., 2005) dentre muitas outras.

## **2.1 Contaminação alimentar**

O número e a variedade de alimentos aumenta cada vez mais no mercado, grande parte da qual processados industrialmente. Isso levanta inúmeros problemas relacionados à segurança alimentar dos produtos consumidos, como contaminação por patógenos e microrganismos deteriorantes. Cada vez mais surgem novas técnicas de proteção e conservação de alimentos, como pesquisas para descobrir novos meios de preservação alimentar, tais como choque ácido (Arvizu-Medrano & Escartin, 2005), gel comestível baseado em *Aloe*

vera (Valverde et al., 2005), processos com alta pressão (Fonberg-Broczek et al., 2005), utilização de campo elétrico pulsado (Gomez et al., 2005), aplicação de ultra-som (Piyasena et al., 2003), além de muitos outros trabalhos interessados em melhorar a segurança dos alimentos e aumentar a vida de prateleira dos produtos.

O tratamento térmico é o procedimento mais utilizado, para a inativação microbiana nos alimentos. Contudo, o calor causa alguns efeitos indesejáveis nas propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais dos alimentos, contrariando a procura crescente dos consumidores por alimentos “minimamente processados” (Ross et al., 2003).

A refrigeração, também é muito utilizada para conservação dos alimentos, pois a vida de prateleira dos produtos alimentícios é estendida pela refrigeração visto que o metabolismo dos microrganismos é reduzido em baixas temperaturas. O grande problema desse método é a adaptação dos microrganismos a baixas temperaturas, ou seja, toleram e conseguem sobreviver em temperaturas reduzidas (Russel, 2002).

A demanda por alimentos mais “naturais” e o problema da adaptação dos microrganismos tem promovido o desenvolvimento de métodos alternativos para a inativação microbiana. A utilização de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias vem sendo estudada e sugerida como uma nova alternativa para a conservação de alimentos (Papagianni, 2003).

## 2.2 Resistência a antimicrobianos

O uso contínuo de antimicrobianos tem resultado no surgimento de linhagens bacterianas multiresistentes em todo o mundo. Além disso, esse mesmo efeito é visto no comércio, onde os antimicrobianos podem ser indiscriminadamente administrados aos animais, como as aves (Marshall & Arenas, 2003). A ação dos antimicrobianos facilita a seleção de bactérias mutantes que são capazes de crescer na presença destes que antes as inibiam, exercendo uma pressão seletiva (Overbye & Barrett, 2005). Bax et al. (1998) apontam que algumas bactérias resistentes possuem genes que determinam resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos e que são capazes de transferir esses genes para outras bactérias, além de se multiplicarem rapidamente.

Existem diversos casos, já relatados, de patógenos humanos resistentes a diferentes antimicrobianos e classes de antimicrobianos: Von Baum & Marre (2005) relataram, em seu trabalho, a resistência antimicrobiana da espécie *Escherichia coli*, Poros-Gluchowska & Markiewicz (2003) descrevem a resistência de *Listeria monocytogenes*, Walsh et al. (2001) relataram a resistência a antimicrobianos convencionais pelo gênero *Listeria* incluindo *Listeria innocua* e *monocytogenes*, além desses, muitos outros trabalhos relatam a resistência de espécies patogênicas bacterianas resistentes.

A resistência a certos antimicrobianos é uma característica intrínseca e inerente de alguns microrganismos. A resistência intrínseca é devido à

impermeabilidade da membrana celular, formação de biofilmes e à expressão de genes mediando a inativação enzimática. A resistência pode, ainda, surgir por aquisição de DNA extracelular e assim podendo ser disseminada através de plasmídeos, transposons e seqüências de inserção (Sheldon, 2005).

De acordo com French (2005), logo que surgiram infecções causadas por microrganismos resistentes, a indústria farmacêutica foi capaz de prover vários antimicrobianos efetivos contra essas linhagens resistentes, entretanto poucos novos agentes antimicrobianos têm sido desenvolvidos nas últimas duas décadas.

A resistência de patógenos a antimicrobianos é o maior problema clínico mundial de interesse na saúde pública. Segundo Okeke et al. (2005) e French (2005), a presença dos microrganismos resistentes afetam, não somente, a mortalidade mas, também, o custo do tratamento, a expansão da doença e a duração da mesma. Diversas estratégias estão emergindo para ajudar a solucionar esse problema crítico. Dentre as soluções correntes encontram-se o uso dos antimicrobianos com parcimônia e a descoberta de novos antimicrobianos alternativos.

### **2.3 Peptídeos antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos são proteínas de baixo peso molecular, possuindo atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e fungos. Esses peptídeos conservados são geralmente carregados positivamente e são, na

maioria das vezes, anfipáticos, possuindo tanto domínio hidrofóbico quanto hidrofílico, o que capacita a molécula a ser solúvel em ambiente aquoso e também, em membranas lipídicas (Izadpanah & Gallo, 2005). Estes compostos vêm sendo isolados de diferentes espécies de vertebrados e invertebrados, bem como, de microrganismos.

Os peptídeos com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias, na sua totalidade, parecem ser mais potentes que os produzidos por eucariotos, pois na maioria dos casos são ativos em baixas concentrações (Fimland et al., 2005).

Mesmo possuindo uma grande variabilidade na estrutura e na natureza química, a maioria desses peptídeos antimicrobianos apresenta atividade antimicrobiana sobre as membranas da célula alvo. A condição desses peptídeos antimicrobianos serem produzidos por microrganismos, tem conduzido as pesquisas a considerarem essas moléculas como “antimicrobianos naturais” e, assim, uma nova alternativa aos antimicrobianos sintéticos (Marshall & Arenas, 2003).

### **2.3.1 Peptídeos antimicrobianos produzidos ribossomalmente e não ribossomalmente**

Peptídeos sintetizados não ribossomalmente podem ser produzidos por bactérias, fungos e estreptomicetos. São peptídeos que contêm dois ou mais resíduos derivados de aminoácidos e são produzidos por enzimas peptídeo sintetases e não nos ribossomos (Hancock & Chapple, 1999). Como exemplo

temos o glicopeptídeo vancomicina, que é produzido por Actinomicetos (Süssmuth & Wohlleben, 2004). Embora muitos peptídeos antimicrobianos produzidos não ribossomalmente sejam conhecidos há muitas décadas, muitos outros estão sendo descritos na literatura, fazendo destas moléculas uma fonte em potencial de novos antimicrobianos (Hancock & Chapple, 1999).

Peptídeos antimicrobianos produzidos ribossomalmente são largamente distribuídos na natureza, sendo produzidos por mamíferos, pássaros, anfíbios, insetos, plantas e microrganismos. A maioria deles matam as bactérias permeabilizando as suas membranas (Papagianni, 2003). Os peptídeos produzidos ribossomalmente por bactérias são referidos, geralmente, como bacteriocinas. Os antimicrobianos convencionais não estão incluídos, pois não são sintetizados ribossomalmente (Papagianni, 2003). As bacteriocinas compartilham algumas propriedades físico-químicas, como serem catiônicas, hidrofóbicas e/ou anfífilas, pequenas em tamanho e diferente dos peptídeos antimicrobianos produzidos por eucariotos, geralmente, não são de amplo espectro, tendo atividade somente contra bactérias da mesma espécie ou espécies relacionadas (Diep & Nes, 2002).

### **2.3.2 Classificação das bacteriocinas**

A classificação das bacteriocinas tem sido baseada no estudo de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas. Elas podem ser divididas em três classes principais, de acordo com essa classificação:

1) Classe I: são os lantibióticos, que, na maioria das vezes, são encontrados em bactérias Gram-positivas. Possuem resíduos de aminoácidos modificados, lantionina ou  $\beta$ -metil-lantionina. Os lantibióticos podem, ainda, conter outros resíduos incomuns que resultam de modificações pós-tradução. Os lantibióticos são divididos em duas subclasses: peptídeos lineares e peptídeos catiônicos. Como exemplos da classe I temos: a nisina, subtilina, lactocina S, entre outras.

2) Classe II: contêm bacteriocinas pequenas, estáveis ao calor e não modificadas, são denominadas como não lantibióticos. A classe II das bacteriocinas é dividida em, pelo menos, dois subgrupos: bacteriocinas antilisteriais similares a pediocina (“pediocin-like”) e bacteriocinas de dois peptídeos, pois a ação antimicrobiana depende da atividade complementar de dois peptídeos. Como exemplo da classe II temos: pediocina, enterocina, lactococina, lactacina F, entre outras.

3) Classe III: são, normalmente, grandes em tamanho e são facilmente inativadas por calor. Como exemplo da classe III temos: helveticina, enterolisina, entre outras. (Diep & Nes, 2002; Cotter et al., 2005).

### **2.3.3 Bacteriocinas vs. antibióticos**

As bacteriocinas são freqüentemente confundidas, na literatura, com antibióticos. Segundo Cleveland et al (2001), as principais diferenças entre as bacteriocinas e os antibióticos são as seguintes: enquanto que as bacteriocinas são sintetizadas ribossomalmente os antibióticos não; geralmente as bacteriocinas apresentam espectro de ação antimicrobiana restrito enquanto que os antibióticos possuem espectro variado; na maioria das vezes o modo de ação das bacteriocinas baseia-se na interação destas com as membranas bacterianas formando poros, enquanto que o mecanismo de ação dos antibióticos pode ser tanto pela interação com a membrana celular da célula alvo ou com alvos intracelulares.

### **2.3.4 Modo de ação dos peptídeos antimicrobianos**

Muitos peptídeos antimicrobianos ligam-se às membranas negativamente carregadas permeabilizando-as, o que resulta na formação de uma via para a movimentação de íons, solutos e do próprio peptídeo (McElhaney and Prenner, 1999).

A ação dos peptídeos antimicrobianos induz defeitos na membrana, como separação de fase ou afinamento da membrana, formação de poros, promoção da estrutura lipídica não-lamelar ou o rompimento da bicamada, dependendo das propriedades de ambos peptídeo e lipídeo (Lohner & Prenner, 1999).

Segundo Subbalakshmi & Sitaram (1998), alguns peptídeos antimicrobianos podem atingir moléculas intracelulares, como o DNA ou enzimas, desde que sejam capazes de atravessar as membranas bacterianas internas e externas.

Existem peptídeos que assumem uma estrutura anfipática de  $\alpha$ -hélice quando se ligam a uma membrana. Sabe-se que a natureza hidrofóbica e catiônica dos peptídeos é importante para a interação inicial entre o peptídeo e a membrana bacteriana (Hancock & Chapple, 1999).

O principal modo de ação das bacteriocinas, como já mencionado, baseia-se na interação do peptídeo com a membrana bacteriana. Em geral, os lantibióticos alongados, catiônicos e anfifílicos são ativos através da formação de poros, enquanto que os lantibióticos globulares agem através da inibição enzimática. A maioria das bacteriocinas da classe II age induzindo a permeabilização da membrana bacteriana e o subsequente vazamento das moléculas da célula atingida.

O mecanismo de ação das bacteriocinas da classe III é distinto de todas as outras bacteriocinas, elas agem provocando a lise de células sensíveis, catalisando a hidrólise da parede celular (Cotter et al., 2005).

### **2.3.5 Aplicações industriais**

Os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias estão sendo objeto de várias pesquisas em todo o mundo, devido ao seu potencial na preservação dos alimentos. E, ainda, são ótimos candidatos para resolver o problema da resistência dos microrganismos patogênicos aos antimicrobianos convencionais.

Até o presente momento, somente a nisina, dentre as bacteriocinas, tem alcançado aceitação comercial para ser utilizada em algumas aplicações, porém, estudos de várias outras bacteriocinas têm gerado resultados promissores para a sua utilização industrial (Diep & Nes, 2002). O antibiótico nisina é um componente comercialmente disponível, utilizado em várias aplicações como em queijos, produtos com ovos, vegetais, em diversos produtos lácteos pasteurizados e em molhos para saladas (Papagianni, 2003). Ainda, as bacteriocinas têm apresentado potencial na bioconservação de carnes, alimentos crus, peixes, bebidas alcoólicas, vegetais fermentados, podendo ser utilizada sozinha ou em combinação com outros métodos de preservação (O'Sullivan et al., 2002; Chen & Hoover, 2003).

O uso de filmes lantibióticos em embalagens, especialmente da nisina, mostrou bons resultados em prevenir a adesão e o crescimento de certas bactérias patogênicas como a *Listeria monocytogenes*. Alguns peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias apresentam atividade antiviral e potencial para ser utilizado como imunossupressores. Existem alguns com propriedades similares aos detergentes, assim tendo um ótimo potencial para o uso como emulsificante nas formulações de drogas e como promotores da absorção de drogas (Diep & Nes, 2002).

Existe uma grande preocupação com a contaminação de alimentos com *Listeria monocytogenes*, visto que este patógeno é a causa de aproximadamente 25% das mortes anuais causadas por patógenos alimentares nos EUA. A classe IIa das bacteriocinas, que são as bacteriocinas antilisteriais, podem ser uma solução ideal para este problema, especialmente com respeito aos alimentos fermentados (Cotter et al., 2005).

A ausência de toxicidade de alguns peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias e a sua atividade contra patógenos Gram-positivos conduzem à possibilidade de seu potencial em aplicações clínicas. Além disso, o fato de alguns desses peptídeos serem ativos contra uma variedade de patógenos multirresistentes faz deles uma opção atrativa para serem utilizados como agentes terapêuticos no lugar das drogas convencionais. Testes *in vivo* com modelo animal já demonstraram o sucesso de alguns lantibióticos no tratamento de

infecções causadas por *S. pneumoniae* (Goldstein et al., 1998) e no tratamento de infecções por *S. aureus* resistente à meticilina (Niu & Neu, 1991; Kruszewska et al., 2004).

A nisina e a lacticina 3147 já foram indicadas à prevenção de infecções por mastite estafilocócica e estreptocócica em animais (Ryan et al., 1999; Twomey et al., 2000). E ainda, existem relatos de grande eficácia da nisina como agente contraceptivo, já que apresenta ação espermicida quando aplicada intravaginalmente (Aranha et al., 2004; Reddy et al., 2004).

### **2.3.6 Purificação**

Existe uma variedade de combinações de procedimentos de purificação de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias. Esta grande variedade se deve à natureza extremamente heterogênea desses peptídeos (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1993).

Segundo Schügerl (2000) e Tagg et al. (1976), normalmente a purificação é iniciada através da concentração do sobrenadante da cultura, através de precipitação fracionada com ácidos, sais, etanol, ou com vários solventes em conjunto. A subsequente purificação pode ser baseada nos diferentes tamanhos das moléculas, tais como: adsorção em cromatografia, ultrafiltração, que se efetiva em nível molecular filtrando moléculas de aproximadamente 20 a 50 Å e centrifugação, ou ainda, por diferença de carga, como: cromatografia de troca iônica, que funciona devido à polaridade das

moléculas que tendem a se atrair mutuamente e eletroforese. Ou também, através do método de extração, que é baseado na afinidade do peptídeo antimicrobiano a solventes orgânicos e sua solubilidade em soluções concentradas de sais e ao seu pH. As propriedades anfífilas desses peptídeos são usadas em estudos para separar os peptídeos da interface de líquidos imiscíveis (Burianek & Yousef, 2000).

Existem muitos relatos indicando que, quanto mais pura estiver a bacteriocina, mais instável ela é. Como exemplo temos a mesentericina Y105 (Hécharde et al., 1992) e a leucocina A-UAL 187 (Hastings et al., 1991), que depois de purificadas se tornaram muito instáveis.

#### **2.4 O gênero *Bacillus***

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* vêm sendo muito utilizadas em aplicações industriais, ocupando o maior lugar dentre os outros microrganismos com aplicações práticas. Eles são organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como sua alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação, sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e o estado GRAS (Generally Recognized as Safe), considerado pelo FDA (Food and Drug Administration), de algumas espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Schallmey et al., 2004), as quais são muito próximas, filogeneticamente, de

*Bacillus amyloliquefaciens*. Estes organismos são uma fonte muito importante de enzimas extracelulares utilizadas industrialmente, incluindo proteases e amilases.

Quanto a peptídeos antimicrobianos produzidos por membros do gênero *Bacillus*, em 1977 já existiam 167 descritos, dos quais 66 associados a linhagens da espécie *Bacillus subtilis* e 23 eram produtos da espécies *Bacillus brevis*. (Katz & Demain, 1977). Outras espécies do gênero *Bacillus* produtoras de peptídeos antimicrobianos são: *Bacillus cereus* (Bizani et al., 2005), *Bacillus licheniformis* (Mendo et al., 2004), *Bacillus thuringiensis* (Ahern et al., 2003), *Bacillus sphaericus* (Cetinkaya et al., 2003), *Bacillus polyfermenticus* (Lee et al., 2001), dentre outros.

Peptídeos cíclicos como as gramicidinas S, tirocidinas e bacitracinas, e lipopeptídeos como as iturinas, bacilomicinas e fengicinas são metabólitos secundários isolados característicos de bactérias do gênero *Bacillus* (Gebhardt et al., 2002).

## **2.5 *Bacillus amyloliquefaciens***

As linhagens bacterianas pertencentes a essa espécie são bastonetes Gram-positivos, catalase positivos e formadores de esporos (Sneath et al., 1986). Primeiramente, a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* foi proposta por Fukumoto (1943) para abrigar as linhagens de *Bacillus subtilis* que produziam amilases, mas a proposta não foi aprovada. Somente mais tarde a espécie foi retomada por Priest et al. (1987). Esta espécie é muito semelhante a *Bacillus subtilis*, Xu & Cote

(2003) reportaram que a região final 3' dos genes 16S-23S é altamente conservada entre as espécies *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, o que não ocorre entre as outras espécies de *Bacillus*. Porém, a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* pode ser distinguida de *Bacillus subtilis* por possuir uma porcentagem molecular de G+C um pouco maior em seu DNA, enquanto *B. subtilis* possui entre 41,5 e 43,5%, *B. amyloliquefaciens* possui em torno de 43,5 a 44,9% de G+C (Yoshida et al., 2001). Além disso, Welker & Campbell (1967) citaram outras características que se diferenciam entre essas duas espécies: *B. amyloliquefaciens* tem a capacidade de crescer em solução contendo 10% de NaCl e fermenta a lactose produzindo ácido, enquanto que *Bacillus subtilis* não o faz.

*Bacillus amyloliquefaciens* produz uma diversidade de enzimas, tais como:  $\alpha$ -amilase, galactanase, isoamilase, mananase, xilanase, metal protease, serina protease, fosfatase alcalina, ribonuclease (Priest, 1977). Já existem muitas aplicações industriais das enzimas produzidas por *B. amyloliquefaciens*: as proteases alcalinas são muito utilizadas na indústria de detergentes e as amilases são utilizadas na indústria de bebidas (Schallmey et al., 2004). Além dessas enzimas com aplicações práticas, existe uma ribonuclease produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, chamada Barnase, que é muito utilizada para controlar o sistema de polinização de plantas (Lannenpaa et al., 2005).

A FDA (Food and Drug Administration) afirmou, no registro federal, que preparações das enzimas carboidrase e protease derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* são consideradas GRAS para serem utilizadas como ingredientes em alimentos. Esse fato pode indicar que outras enzimas e substâncias produzidas por este microrganismo possam, também, ser utilizadas em alimentos futuramente (Federal Register, 1999).

Quanto à produção de substâncias antimicrobianas por linhagens desta espécie bacteriana, Yoshida et al. (2001) verificou a existência de atividade antifúngica e inibidora de algumas bactérias fitopatogênicas no sobrenadante filtrado da cultura de uma linhagem pertencente a esta espécie. De acordo com Stein (2005), o potencial de uma certa linhagem de *Bacillus subtilis* para a síntese de peptídeos antimicrobianos é comparável com *B. amyloliquefaciens*, sendo aproximadamente 7,5% do genoma dedicado à produção dos antimicrobianos. O autor descreveu, ainda, que *B. amyloliquefaciens* produz antimicrobianos como *B. subtilis*, porém não tanta variedade.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes equipamentos: câmara de fluxo laminar vertical marca Pachane, modelo PA 115; autoclave vertical, marca Phoenix, modelo AV75; incubadora com agitação, marca Nova Técnica, modelo NTPH2; geladeira, marca Eletrolux, modelo Prosdócimo R26; freezer vertical, marca Consul, modelo Practice 240; estufas incubadoras, marca De Leo; aparelho purificador de água, marca Honeywell Braukmann TKA; destilador de água, marca Biomatic; banho-maria, marca Thermomix; centrífuga refrigerada, marca Hermle, modelo 5410; espectrofotômetro, marca Hitachi, modelo U-1100; medidor de pH, marca Nova Técnica; contador de colônias, marca Phoenix, modelo CP 608, microscópio, marca Olympus CX40; agitador de tubos “vortex”, marca Biomatic; capela de exaustão de gases; bomba de vácuo, marca Quimis Aparelhos Científicos LTDA, modelo 355B; cuba para eletroforese marca Hoefer Scientific, modelo Mighty Small, fonte de eletroforese Pharmacia LKP EPS 500/400.

### 3.2 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar-ágar (Merck); caldo de cérebro e coração (Merck); ágar nutriente (BBL Becton Dickinson); caldo Mueller Hinton (Oxoid); caldo triptona de soja (Acumedia); ágar Man Rogosa e Shape (Oxoid); extrato de levedura (Biobrás); peptona bacteriológica (Oxoid); peptona de carne (Merck); ágar MacConkey (Oxoid); extrato de carne (Oxoid); lactose (Merck).

### 3.3 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: etanol (Merck); butanol (Merck); N,N'-metilendiacrilamida (Merck); N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED – Riedel de Haën); Triton X100 (Sigma); deoxicolato de sódio (Merck); Dodecil Sulfato de Sódio (Nuclear); ácido clorídrico (Merck); ácido etilendiaminotetracético dissódico (EDTA – Riedel de Haën); fosfato de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Nuclear); fosfato de sódio (Merck); cloreto de sódio (Merck); glicina (Merck); Coomassie R250 (Merck); verde de malaquita (Nuclear); fucsina (Inlab); cristal violeta (Inlab); safranina T (Riedel de Haën); Sephadex G100 (Pharmacia); tripsina de pâncreas suino tipo II (Sigma); pronase E (Sigma); ninidrina (Merck); hidridantina (Sigma); etilenoglicol monometil éter (Vetec); acetato de sódio (Baker); reagente folin Ciocalteou (Polipur).

### **3.4 Isolamento do Microrganismo produtor da substância antimicrobiana**

As amostras do solo de Mata Atlântica de Santa Catarina, foram obtidas removendo a camada superficial do solo e coletando cerca de 10cm de profundidade do solo. Uma amostra de solo de 100g (peso úmido) foi misturada com água estéril (1 :1 p / v), homogeneizada e incubada por 1 h à temperatura ambiente. Um mL da fase aquosa superior desta suspensão foi inoculado em 100 mL de caldo nutriente, foi feita uma diluição seriada deste inóculo de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Foi aplicado 300 $\mu$ L das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em placas de ágar Mueller Hinton e foi realizado o espalhamento em superfície com alça de Drigalski. Após o período de 24 horas a 30° C, as colônias que apresentavam inibição contra as outras colônias existentes ao redor, foram isoladas e testadas para a verificação de existência de atividade antimicrobiana contra as bactérias indicadoras *Bacillus cereus* ATCC9634, *Listeria monocytogenes* ATCC7644, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. O microrganismo produtor foi selecionado levando-se em consideração o potencial de inibição contra as bactérias indicadoras e o diâmetro dos halos de inibição formados.

#### **3.4.1 Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica**

Alguns teste morfológicos e bioquímicos (Tabela 2) foram realizados para a verificação do gênero do microrganismo produtor selecionado. Para a

confirmação do gênero foi utilizado o sistema API 50 CHB e o software APILAB Plus (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

### **3.4.2 Sequenciamento da região ribossomal 16S**

Foi realizado o sequenciamento do DNA ribossomal 16S da bactéria LBM 5006, para melhor definir a espécie da bactéria produtora.

Foi feita a extração do DNA total da bactéria LBM 5006, de acordo com o método descrito por Flamm et al. (1984). A amplificação do DNA foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e clonado no vetor pZERO<sup>TM</sup>-2. Por fim, os produtos amplificados foram sequenciados utilizando um DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit para MegaBACE (Amersham-Pharmacia Biotech). Os dados filogenéticos foram obtidos através do alinhamento das sequências, utilizando o programa CLUSTAL W versão 1.8 (Thompson et al. 1994) e comparando com as sequências presentes no GeneBank® (Apêndice 1).

### **3.5 Microrganismos indicadores**

Para verificar a existência de sensibilidade à substância antimicrobiana produzida pela LBM 5006, foram utilizadas diferentes culturas de microrganismos patogênicos e deteriorantes de importância alimentar que estão descritos na Tabela 1, com sua respectiva origem.

### **3.6 Manutenção dos microrganismos**

Todos os microrganismos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram mantidos a  $-20^{\circ}$  C congelados em seus respectivos meios de cultura acrescidos de 20% de glicerol estéril.

Para a utilização de um determinado microrganismo, a cultura congelada era inoculada em caldo e, posteriormente, era repicado em meio sólido, sendo periodicamente transferidos para novo meio.

Na Tabela 1 estão relacionados os microrganismos indicadores utilizados, juntamente com os respectivos meios de cultura utilizados e as temperaturas ótimas de incubação. Para a linhagem produtora foi utilizado BHI e a temperatura de  $37^{\circ}$  C.

**TABELA 1:** Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento

<b>Culturas indicadoras</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Temperatura de incubação (°C)</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC9634	BHA	37
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	BHA	37
<i>Candida kefir</i> (efluente)	PA	37
<i>Candida</i> sp. (alimento)	PA	37
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	BHA	37
<i>Enterococcus faecalis</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Erwinia carotovora</i> (alimento)	BHA	25
<i>Escherichia coli</i> 25922	BHA	37
<i>Escherichia coli</i> (alimento – LACEN)	BHA	37
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	BHA	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	MRSA	30
<i>Lactococcus lactis</i> R 704	MRSA	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BHA	37
<i>Listeria innocua</i> (alimento - LARA)	BHA	37

**TABELA 1:** Continuação - Microrganismos indicadores utilizados e condições de crescimento

<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHA	37
<i>Malassezia paquidermatis</i> (isolado clínico)	PA	37
<i>Micrococcus luteus</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Pasteurella haemolytica</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Proteus vulgaris</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Rhodococcus</i> sp. (isolado clínico)	BHA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	BHA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento – LACEN))	BHA	37
<i>Salmonella gallinarum</i>	BHA	37
<i>Serratia marcescens</i>	BHA	37
<i>Staphylococcus</i> sp. (isolado clínico)	BHA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> (alimento – LACEN)	BHA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	BHA	37
<i>Staphylococcus intermedius</i> (isolado clínico)	BHA	37
<i>Streptococcus</i> sp. (isolado clínico - $\alpha$ - hemolítico)	BHA	37

---

BHA, ágar de cérebro e coração; PA, ágar batata; MRSA, ágar Man Rogosa e Shape

### **3.7 Obtenção do extrato bruto**

Primeiro foi realizado um pré-inóculo da bactéria em frascos de 50 mL contendo 20 mL de caldo de cérebro e coração (BHI) e uma alçada da cultura, produtora da atividade antimicrobiana, retirada de placas de ágar cérebro e coração (BHA). A cultura foi incubada a 37° C por 24 horas em incubadora com agitação (125 rpm).

Após o período de incubação, uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de BHI, incubando-se durante 48 horas com agitação (125 rpm). Posteriormente, a cultura foi centrifugada durante 15 min a 10.000 g. A esterilização foi feita através de filtros de celulose com poros de 0,22 µm (para volumes pequenos) ou mediante filtração a vácuo com filtros de sílica de 0,22 µm (para volumes maiores). O extrato filtrado foi conservado em geladeira a 4° C até a utilização.

### **3.8 Avaliação da produção da substância antimicrobiana em diferentes condições de cultivo**

Um mL de um pré-inóculo de uma cultura (BHI) da bactéria produtora da substância antimicrobiana, foi inoculado em dois frascos, erlen-meyer, contendo 100mL de BHI em cada, um dos frascos foi incubado a 30°C e outro a 37 °C. Após 24 e 48 horas, foi coletada uma alíquota de 20 µL dos dois cultivos. Após as alíquotas filtradas, foram testadas contra *L. monocytogenes* e *B. cereus*, através do método de difusão em ágar com discos (Kimura et al., 1998), para verificar o melhor período e temperatura de incubação para obter uma maior atividade antimicrobiana.

Após o primeiro teste, a bactéria foi cultivada em seis meios diferentes: TSB (caldo triptona de soja), NB (caldo nutriente), BHI (infusão de cérebro e coração), MHB (caldo Müller Hinton), caldo lactosado (3 g l<sup>-1</sup> extrato de carne, 5 g l<sup>-1</sup> peptona, 5 g l<sup>-1</sup> lactose) e água peptonada (8 g l<sup>-1</sup> NaCl, 1 g l<sup>-1</sup> peptona), incubando durante o melhor período e temperatura verificados no teste anterior. Após o período de incubação, o extrato filtrado foi testado contra *B. cereus* e *L. monocytogenes*.

### **3.9 Curva de crescimento e produção**

Foi realizada uma curva de crescimento e produção a 37°C em meio líquido (BHI) para avaliar a cinética de produção da substância antimicrobiana.

#### **3.9.1 Preparação do pré-inóculo**

A bactéria produtora foi inoculada em frascos de 50 mL contendo 20 mL de BHI e incubada a 37°C com agitação (125 rpm) por 24 horas.

#### **3.9.2 Curva de crescimento**

Após o período de incubação do pré-inóculo, uma alíquota de 1 mL, contendo aproximadamente  $10^5$  UFC/mL, foi transferida para um frasco contendo 100 mL de BHI. Este foi considerado o ponto zero da curva. Em intervalos de 4 horas foram realizados a medida da absorbância a 600 nm e a determinação das UA/mL conforme descrito no item 3.10.

### **3.10 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro**

Para determinar a quantidade de atividade antimicrobiana utilizou-se o método de diluição seriada. Em placas de microtitulação, o extrato estéril foi diluído sucessivamente na proporção de 1:1 em PBS (solução fosfato 0,01M e NaCl 0,15M), tendo-se realizado as diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ , etc. Alíquotas de 20 $\mu$ L destas diluições foram inoculadas em discos em placas de BHA

previamente inoculadas com uma solução fisiológica estéril contendo aproximadamente  $10^8$  células/mL (0,5 na escala de Mac Farland) de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e incubadas a 37° C durante 24 horas. A designação UA/mL foi definida como sendo a recíproca da primeira diluição que não apresentou halo de inibição.

### **3.11 Caracterização inicial do extrato bruto**

Foram testados diferentes tratamentos no extrato bruto da cultura, obtido conforme item 3.7, para verificar a natureza desta substância antimicrobiana. Foi verificada a estabilidade da substância quanto à temperatura, frente a diferentes enzimas proteolíticas e verificada a ação desta substância em diferentes pHs. Em cada caso, foi calculada a atividade antimicrobiana residual para detectar se a atividade foi alterada com os tratamentos aplicados. Para isso foram feitos testes de atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, através do método de difusão em ágar (Kimura et al., 1998), sendo utilizado como controle o extrato bruto estéril sem tratamento. Na página seguinte segue a fórmula utilizada para calcular a atividade antimicrobiana residual em porcentagem:

$$A.R. (\%) = \frac{H_T - 6}{H_C - 6} \times 100$$

Sendo:  $H_T$  – Halo do sobrenadante após tratamento (mm)

$H_C$  – Halo do controle (mm)

A.R. – Atividade Residual

### **3.11.1 Espectro de ação**

O extrato bruto foi testado contra as culturas indicadoras descritas no item 3.6 utilizando o método de difusão em ágar com discos (Kimura et al., 1998). Para a realização destes testes, foram feitas suspensões de cada um dos microrganismos indicadores em solução fisiológica estéril contendo aproximadamente  $10^8$  células/ mL (grau 0,5 na escala de Mac Farland). Cada uma das suspensões foi espalhada em placas contendo os meios indicados na Tabela 1 (de acordo com o microrganismo) mergulhando um suabe uma vez em cada suspensão. Após as placas secarem, foram colocados discos de celulose (diâmetro de 6 mm), nos quais foram inoculados 20  $\mu$ L do extrato bruto. Após o período de incubação de 24-48 horas nas condições ótimas de crescimento de cada microrganismo indicador, foi observada a formação de halos de inibição ao redor dos discos, indicando a presença de substância antimicrobiana. Os halos foram medidos com régua milimetrada. O teste foi realizado em triplicata com dois extratos obtidos em diferentes datas.

### **3.11.2 Estabilidade térmica**

Alíquotas de 600  $\mu$ L do extrato bruto foram expostas durante 30 minutos às temperaturas de 10° C (geladeira), em torno de 25° C (temperatura ambiente), 40, 60 e 80° C (banho-maria).

Uma alíquota foi exposta à temperatura de 121° C (autoclave) durante 15 min. Foi verificada a estabilidade da substância frente à temperatura de 100° C,

durante 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Posteriormente, foi calculada a atividade residual conforme descrito no item 3.10. Cada experimento foi realizado em duplicata com dois extratos obtidos em datas diferentes.

### **3.11.3 Ação em diferentes pHs**

Para avaliar a ação da substância antimicrobiana em diferentes pHs o extrato bruto foi incubado em pHs entre 3 e 10 por 2 horas à temperatura de 25° C, utilizando 200 µL dos diferentes tampões: tampão glicina pH 3,0; tampão citrato (pH 4,0 e 5,0); tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tampão tris (pH 9,0 e 10,0) todos em uma concentração de 0,25M. O controle do extrato bruto foi realizado colocando 200 µL de PBS no lugar do tampão. Posteriormente, foi calculada a atividade residual conforme descrito no item 3.10. Os testes foram realizados em duplicata com dois extratos obtidos em datas diferentes.

### **3.11.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas**

Para avaliar a resistência da substância frente a enzimas proteolíticas, o extrato bruto estéril foi incubado com as concentrações de 2 e 10 mg/mL, de cada enzima, durante 1 hora a 37° C com as enzimas protease tipo XXV (Pronase E) e tripsina. Para a realização deste experimento, foram preparadas suspensões enzimáticas de 20 e 100 mg/mL em PBS das enzimas utilizadas. Alíquotas de

180  $\mu\text{L}$  do extrato foram incubadas com 20  $\mu\text{L}$  de cada solução enzimática. Os controles foram realizados da seguinte forma: para as enzimas, 20  $\mu\text{L}$  de solução enzimática e 180  $\mu\text{L}$  de PBS e para o extrato, 180  $\mu\text{L}$  do extrato e 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, foi calculada a atividade residual conforme descrito no item 3.10. Os testes foram realizados em duplicata com três extratos obtidos em datas diferentes.

### **3.12 Purificação**

Foram utilizados dois passos para a purificação da substância antimicrobiana. Em cada um deles foi quantificada a atividade antimicrobiana (UA/mL) conforme item 3.9 e a quantidade de proteína pelo método de Lowry (conforme item 3.11.4) para poder calcular o fator de purificação e o rendimento em cada passo.

#### **3.12.1 Cromatografia de gel filtração (G-100)**

Primeiramente, 20 mL do extrato bruto foram liofilizados, afim de concentrar a amostra. Após a liofilização, o material foi dissolvido em 720  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 10mM pH 6,0 e foi designado como amostra I. Foi quantificada a atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9) e a proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.11.4). O restante foi aplicado em uma coluna de gel filtração (tamanho 1,0 x 42 cm) Sephadex G-100 pré-equilibrada com

tampão fosfato 10 mM pH 6,0. Frações de 1 mL foram coletadas em tubos de microcentrifuga e a absorbância foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro. Todas as frações foram testadas quanto à atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 através do método de difusão em ágar com discos (Kimura et al., 1998).

### **3.12.2 Extração com solvente orgânico**

Para realizar a extração da substância com solvente orgânico, as alíquotas obtidas no item anterior com atividade antimicrobiana foram agrupadas, foi quantificada a atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9) e a proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.11.4), estas frações agrupadas foram designadas como amostra II. A cada 1 mL destas frações agrupadas foi adicionado 600  $\mu$ L de butanol. Após homogeneizar, foi centrifugado a 10.000 g durante 10 minutos a fim de separar a fase orgânica. Esta foi removida para um becker deixado em estufa a 30° C para que o butanol fosse evaporado. Após a evaporação do butanol, o “pellet” foi ressuscitado em 1 mL de água destilada estéril e novamente liofilizado. O material desta última liofilização foi dissolvido em 70  $\mu$ L de tampão fosfato 10 mM pH 6,0 e foi designado como amostra III, tendo sido quantificada a atividade antimicrobiana em UA/mL (conforme item 3.9) e a proteína solúvel pelo método de Lowry (conforme item 3.11.4).

### **3.12.3 Caracterização da substância antimicrobiana purificada**

Para caracterizar a substância após a purificação, foram repetidos os testes de estabilidade térmica e estabilidade frente a enzimas proteolíticas. Para avaliar a estabilidade térmica após a purificação, foram testadas as seguintes temperaturas: 60 e 80°C durante 30 minutos e 100 °C durante 5 e 10 minutos. Para avaliar a estabilidade frente a enzimas proteolíticas após a purificação foram testadas as seguintes enzimas: tripsina e protease tipo XXV (Pronase E), ambas nas concentrações finais de 2 e 10 mg/mL.

#### **3.12.3.1 Teste qualitativo de ninidrina**

O teste de ninidrina é classicamente utilizado no estudo de aminoácidos e de pequenos peptídeos. A presença de grupos amino terminais fornece, após a reação com ninidrina uma cor azulada.

A amostra extraída com butanol foi ressuspensa em 0,5 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,0, após foi adicionado à amostra 0,5 mL de solução de ninidrina (ninidrina 2%, hidridantina 0,3% dissolvidas em 75% metil celosolve e 25% tampão acetato de sódio 1M pH 5,5). A amostra, foi então, posta em banho-maria a 100° C durante 15 minutos. Após, adicionou-se 5,0 mL de etanol 50% e observou-se a coloração da amostra, a absorbância foi medida a 440 nm. Como controle positivo foi utilizada 0,5 mg/mL de glicina diluída em 0,5 mL do mesmo tampão em que a amostra foi ressuspensa. Como controle negativo e branco utilizou-se somente tampão.

### 3.12.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, conforme descrito por Hames (1981) com modificações sugeridas por Bizani et al. (2005), a fim de estimar o peso molecular da substância e o seu grau de pureza. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 50  $\mu$ L de tampão tris HCl 0,5 M contendo 0,01% de azul de bromofenol e SDS 10%. Posteriormente, as amostras foram fervidas durante 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 14%. A eletroforese foi realizada utilizando um sistema Mighty Small com uma corrente de 20 mA por gel. Após a eletroforese, o gel foi partido, as mesmas amostras foram aplicadas nas duas metades e uma das metades foi lavada com água destilada estéril várias vezes para a remoção do SDS e, posteriormente, colocada sobre uma placa contendo uma fina camada de BHA. Sobre ele foi vertido BHA contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644. Após 24 horas de incubação em estufa a 37° C foi observada a presença de halos de inibição na banda correspondente à substância antimicrobiana de natureza protéica existente. A outra metade do gel foi corada com Coomassie blue G250 para observar as bandas de proteína. O peso molecular da substância foi estimado através da comparação entre o Rf (mobilidade relativa) da amostra com o Rf de outras proteínas já conhecidas.

### **3.12.3.3 Espectroscopia de infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foi determinado o espectro da amostra purificada liofilizada, por meio da análise no infravermelho, empregando-se a técnica de pastilha com brometo de potássio (Jensen, 1958).

### **3.12.3.4 Espectroscopia de ultravioleta**

Para realizar a espectroscopia no ultravioleta, a substância purificada liofilizada foi ressuspensa em 1mL de água destilada estéril, sendo posteriormente feita uma diluição seriada da substância ressuspensa. Foi determinado o espectro da substância em espectrofotômetro de ultravioleta (Ultrospec 3100, Pharmacia, Suécia), verificando-se absorvância nos comprimentos de onda de 190 a 330 nm.

### **3.12.4 Determinação da concentração de proteína solúvel**

Para determinar a concentração de proteína solúvel em cada uma das frações obtidas nas etapas de purificação foi utilizado o método de Lowry et al. (1951) com a utilização do reagente de Folin e Ciocalteu (FC). Foi realizada uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA). A absorvância foi medida a 560 nm calculando-se as concentrações de proteína solúvel. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

### 3.13 Curva dose-resposta contra *Listeria monocytogenes*

Uma suspensão em BHI de *Listeria monocytogenes* contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL foi inoculada com diferentes concentrações do extrato bruto (entre 6 UA/mL e 400 UA/mL concentração final) e foi incubada a 37°C durante 60 minutos. Foram determinadas, em cada caso, as UFC/mL finais por meio do método de contagem de colônias. O experimento foi realizado em duplicata.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção do microrganismo produtor

Foram coletadas três amostras de solos de pontos diferentes da mesma região, as quais foram denominadas: solo I, solo II e solo III. Foi verificada presença de atividade antimicrobiana somente em microrganismos isolados da amostra de solo I. Foram isoladas desta amostra, aproximadamente, 10 colônias morfológicamente diferentes. Destas, somente quatro apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Os quatro microrganismos foram denominados: LBM 5004, LBM 5005, LBM 5006 e LBM 5007.

Os isolados LBM 5004 e LBM 5007 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, enquanto que os isolados LBM 5005 e LBM 5006, além de inibirem esses dois microrganismos, inibiram *Escherichia coli*. O isolado LBM 5006 foi escolhido por apresentar zonas de inibição maiores contra os microrganismos testados.

## 4.2 Caracterização da linhagem produtora

### 4.2.1 Análise morfológica e bioquímica

A bactéria apresentou colônias grandes, amplas e irregulares, formação de endósporo, coloração de Gram indicando que a bactéria é Gram-positiva. Os resultados das provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas estão listados na Tabela 2.

Com os resultados da análise das provas morfológicas e bioquímicas, em conjunto com resultados do API 50CHB, a linhagem foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus* (Sneath et al., 1986).

**TABELA 2:** Resultados das provas bioquímicas, morfológicas e fisiológicas do isolado LBM 5006

Provas Bioquímicas e Fisiológicas	Isolado LBM 5006
Comprimento da Célula ( $\mu\text{m}$ )	2,7
Largura da Célula ( $\mu\text{m}$ )	0,7
Forma do Esporo	Elíptico
Deformação/ Esporângio do Esporo	-
Posição do Esporo	Terminal
Coloração de Gram	+
Mobilidade	+

**Tabela 2:** Continuação - Resultados das provas bioquímicas e fisiológicas do isolado LBM 5006

Hidrólise da Esculina	+
Hidrólise da Caseína	+
Hidrólise do Amido	+
Hidrólise da Tirosina	-
Produção da Catalase	+
Produção da Lecitinase	-
Produção do Acetil-Metil Carbinol (Acetoína)	+
Produção do Indol	-
Utilização do Citrato	+
Liquefação da Gelatina	+
Redução do NO <sub>3</sub> — NO <sub>2</sub>	+
Crescimento Anaeróbico	-
Crescimento em NaCl 5%	+
Crescimento em NaCl 7%	+
Crescimento em NaCl 10%	+
Crescimento em pH 5,7	+
Crescimento na temperatura de 50° C	+
Fermentação da Glicose	+
Fermentação da Arabinose	-
Fermentação da Xilose	+
Fermentação do Manitol	+
Fermentação da Glicose – P/ Produção de Gás	-

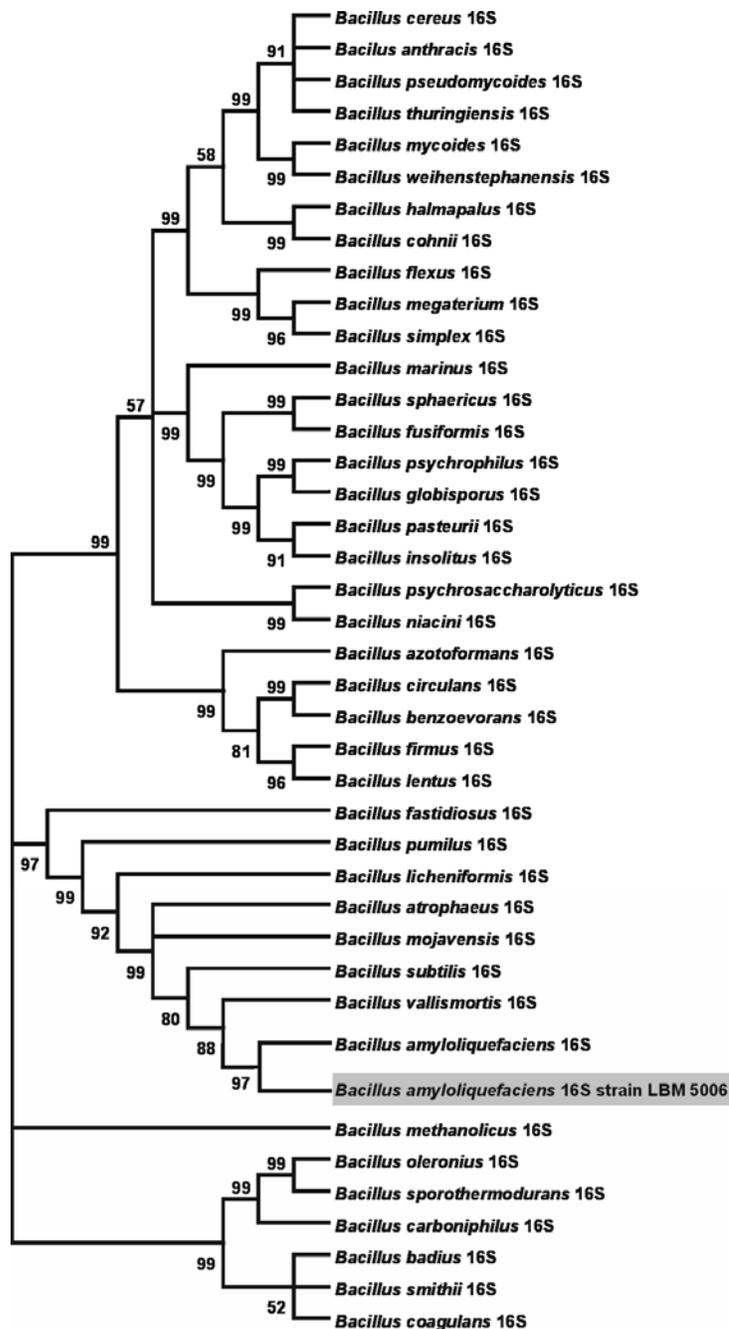
---

#### 4.2.2 Análise filogenética da bactéria LBM 5006

A análise de agrupamento obtida através do método neighbor-joining mostrou que a bactéria isolada LBM 5006 é taxonomicamente muito semelhante à espécie *Bacillus amyloliquefaciens* (Figura 1). A sequência do 16S rDNA da bactéria LBM 5006 apresentou 99% de identidade com a sequência do 16S rDNA da espécie *B. amyloliquefaciens*.

*Bacillus amyloliquefaciens* é muito conhecido por sua produção de enzimas e pelas aplicações destas. No entanto, as pesquisas e trabalhos relacionados à produção de substâncias antimicrobianas por *B. amyloliquefaciens*, no presente momento, não são muitas.

Anadón et al., (2004) não verificaram evidência de toxicidade em culturas de *B. amyloliquefaciens* para serem utilizadas como fonte para produção de enzimas extracelulares, fato que indica a grande possibilidade de utilizar antimicrobianos produzidos por esta espécie como preservativos alimentares.



**FIGURA 1:** Árvore topológica sem raiz obtida pela análise das sequências da região ribossomal 16S do DNA das diferentes espécies de *Bacillus* através do método neighbor-joining. A linhagem LBM 5006 está indicada por uma caixa cinza. O valor de análise (%) dos ramos está indicado nos nós.

### **4.3 Influência das condições de cultivo na produção da substância antimicrobiana**

Houve maiores halos de inibição contra os microrganismos indicadores testados (*B.cereus* e *L. monocytogenes*) quando a bactéria foi incubada a 37° C durante 48 horas (Tabela 3). O extrato bruto que apresentou os maiores halos de inibição contra *B. cereus* e *L. monocytogenes* foi verificado quando a bactéria foi cultivada em caldo BHI (Tabela 4), não havendo atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, quando a bactéria foi cultivada em água peptonada e, ainda, *Listeria monocytogenes* não foi inibida com o extrato bruto da cultura em TSB nem em MHB.

No presente trabalho, foi verificada maior atividade antimicrobiana em 48 horas, indicando que provavelmente a substância tenha sido produzida na fase estacionária de crescimento da bactéria. Yoshida et al. (2001) verificaram em seu trabalho que a máxima atividade antifúngica, produzida pela linhagem RC-2 de *Bacillus amyloliquefaciens*, foi vista no final da fase logarítmica e começo da fase estacionária. Os autores destacaram, ainda, que é reconhecido que muitas espécies de *Bacillus* produzem diversos peptídeos antimicrobianos como metabólitos secundários. Segundo Slepecky & Hemphill (1992), existem muitos membros do gênero *Bacillus* que produzem substâncias antibióticas no final da fase logarítmica ou no início da fase estacionária de crescimento em culturas líquidas.

Kamoun et al. (2005) relataram que a bacteriocina bacturicina F4, produzida por *B. thuringiensis*, é produzida no meio da fase estacionária de crescimento da bactéria.

**TABELA 3:** Atividade antimicrobiana em diferentes condições de cultivo (período e temperatura) sendo o isolado LBM 5006 propagado em BHI.

<b>Condição de crescimento</b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>a</sup> contra <i>Bacillus cereus</i></b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>a</sup> contra <i>Listeria monocytogenes</i></b>
30°C/ 24 h	-	-
30°C/ 48 h	-	-
37°C/ 24 h	9	9,5
37°C/ 48 h	13	13

<sup>a</sup> diâmetro ao redor do disco; - sem inibição

**TABELA 4:** Atividade antimicrobiana em diferentes condições de cultivo (meios de cultura) sendo o isolado LBM 5006 incubado a 37°C/ 48 h.

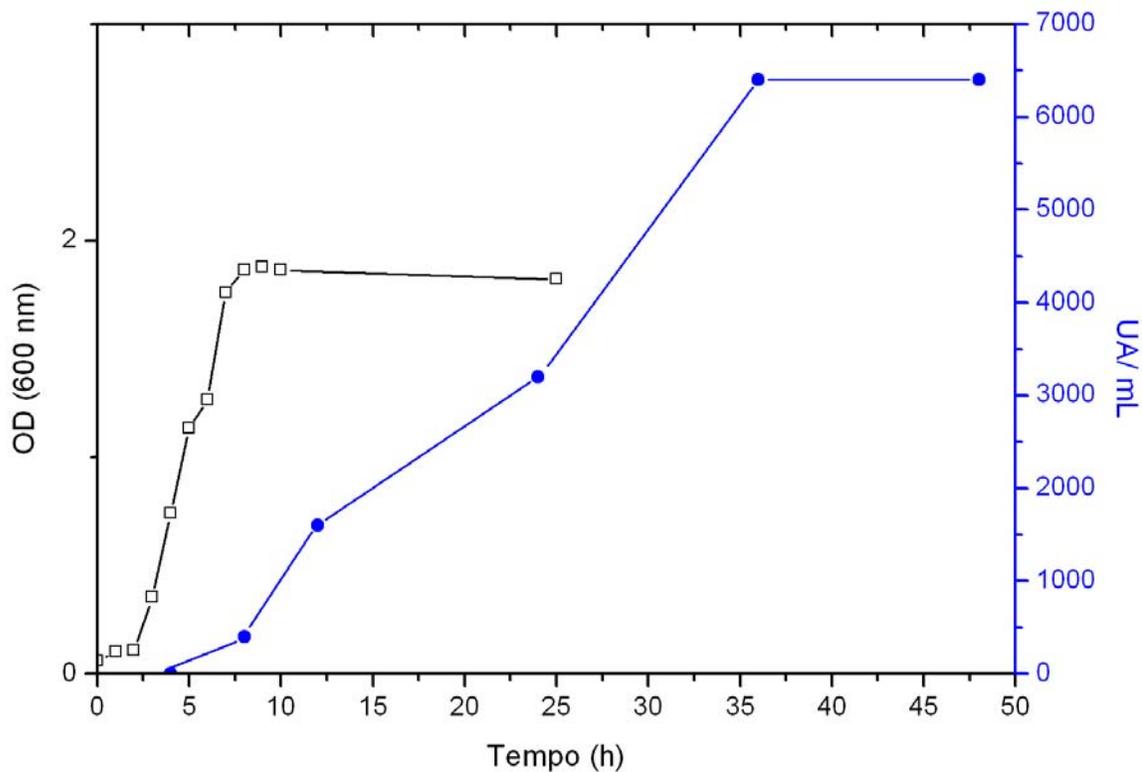
<b>Meio de cultura</b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>a</sup> contra <i>Bacillus cereus</i></b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>a</sup> contra <i>Listeria monocytogenes</i></b>
NB	8	8
Água peptonada	-	-
MHB	9	-
BHI	13	13
Caldo lactosado	10	11
TSB	8	-

<sup>a</sup> diâmetro ao redor do disco; - sem inibição

TSB, caldo triptona de soja; NB, caldo nutriente; BHI, infusão de cérebro e coração; MHB, caldo Muller-Hinton.

#### 4.4 Curva de crescimento e produção

Foi possível verificar, através da curva de crescimento e produção, que a bactéria produtora da substância antimicrobiana começa a produzir a substância no início da fase estacionária de crescimento, tendo o maior pico de produção após 35 horas de crescimento (Figura 2). Esses resultados indicam que a substância é um metabólito secundário.



**FIGURA 2:** Curva de crescimento da bactéria produtora e produção da substância antimicrobiana

## 4.5 Caracterização inicial do extrato bruto

### 4.5.1 Espectro de ação

A Tabela 5 mostra os halos de inibição obtidos ao serem aplicados 20  $\mu$ L do extrato bruto sobre o disco de celulose (6 mm) correspondendo a 8 UA e 256 UA/mL em placa previamente inoculada com determinado microrganismo indicador.

O extrato bruto apresentou um espectro de ação bastante amplo inibindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A aplicação contendo 8 UA/mL da substância antimicrobiana inibiu várias bactérias Gram-positivas incluindo microrganismos patogênicos de grande importância, tais como *B. cereus* e *Listeria monocytogenes*. Entre as bactérias Gram-negativas testadas, inibiu algumas clinicamente relevantes como *Pasteurella haemolytica*, *Proteus vulgaris* e *Serratia marscescens*. E ainda, quando foi aplicado o extrato bruto contendo uma maior concentração da substância antimicrobiana, houve a inibição de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (alimento – LACEN) e *Escherichia coli*. Também houve a inibição da bactéria *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, que é descrita como sensível a todas as bacteriocinas que já foram testadas (Oliveira et al., 1998). Não houve inibição das leveduras testadas.

*Bacillus cereus* é um patógeno transmitido por alimentos que pode causar a síndrome emética, causada por ingestão da toxina pré-formada em alimentos e a síndrome diarréica, causada por uma toxina diferente que pode ser formada no alimento, mas também no intestino delgado (Grande et al., 2006). O antimicrobiano produzido pelo isolado LBM 5006, por inibir esse patógeno é um grande candidato ao uso na prevenção de *B. cereus*.

A Listeriose, causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, é uma doença de origem alimentar com alto risco de mortalidade entre crianças, idosos, grávidas e imunodeprimidos. A bactéria é encontrada em diversos alimentos incluindo vários produtos derivados do leite (O'sullivan et al., 2006). Existem várias bacteriocinas inibidoras de *L. monocytogenes* já descritas, como a Pediocina PA-1, Enterocina AS-48, a Nisina e a Plantaricina C (Martinez et al., 2005). Porém, existem relatos do aparecimento de espécies de *Listeria*, como *L. monocytogenes* e *L. innocua*, tolerantes ou resistentes a algumas dessas bacteriocinas (Martinez et al., 2005 ; Vignolo et al., 2000).

A ação do antimicrobiano produzido pela linhagem LBM 5006 contra *Leuconostoc mesenteroides*, indica o seu potencial para ser utilizado nas indústrias de bebidas e açúcar, pois existe um grande problema que vem sendo enfrentado por elas: a contaminação da cana-de-açúcar por *Leuconostoc mesenteroides*, ocorrendo a deterioração da cana pelos produtos do microrganismo em questão (Tilbury, 1975).

Embora a nisina, que possui aceitação comercial, seja efetiva contra bactérias Gram-positivas, como a *Listeria monocytogenes*, ela é inativa contra bactérias Gram-negativas (Bozianis & Adams, 1999). A substância antimicrobiana avaliada no presente trabalho possui ação contra *Escherichia coli*, que é uma bactéria patogênica Gram-negativa, o que demonstra uma potencial aplicação dessa substância contra esse patógeno.

Também se observou atividade contra o fitopatógeno *Erwinia carotovora*, que é conhecida por causar danos e perdas à produção de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) (Pérombelon & Kelman, 1980).

**TABELA 5:** Espectro de ação do extrato bruto com aplicação de 20 $\mu$ L nos discos correspondendo a 8 UA e 256 UA por disco

<b>Microrganismos indicadores</b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>a</sup> extr. br. correspond. a 8 UA</b>	<b>Halo de inibição (mm)<sup>a</sup> extr. br. correspond. a 256 UA</b>
<b>Gram-positivas</b>		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC9634	9,3	NT
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	9,5 <sup>b</sup>	12,0
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	13,3	NT
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	8,0 <sup>b</sup>	NT
<i>Lactococcus lactis</i> R704	-	NT
<i>Leuconosctoc mesenteroides</i>	9,0	NT
<i>Listeria innocua</i> (alimento – LARA)	25,5	NT
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	9,3	NT
<i>Micrococcus luteus</i> (isolado clínico)	-	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> (isolado clínico)	-	14,0
<i>Streptococcus</i> sp. (isolado clínico - $\alpha$ -hemolítico)	-	NT
<i>Staphylococcus</i> sp (isolado clínico)	12,6 <sup>b</sup>	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> (alimento – LACEN)	-	10,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-

**TABELA 5:** Continuação - Espectro de ação do extrato bruto com aplicação de 20µL nos discos correspondendo a 8 UA e 256 UA por disco

<i>Staphylococcus intermedius</i> (isolado clínico)	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp. (isolado clínico)	17,6	NT
<b>Gram-negativas</b>		
<i>Pasteurella haemolytica</i> (isolado clínico)	12,5	NT
<i>Proteus vulgaris</i> (isolado clínico)	9,0	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (isolado clínico)	-	NT
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	-	NT
<i>Salmonella</i> Enteritidis (alimento – LACEN)	-	-
<i>Salmonella gallinarum</i> (isolado clínico)	12,8	NT
<i>Serratia marcescens</i>	10,6	NT
<i>Erwinia carotovora</i> (alimento)	10,6 <sup>b</sup>	NT
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	9,5
<i>Escherichia coli</i> (alimento - LACEN)	-	9,0

**TABELA 5:** Continuação - Espectro de ação do extrato bruto com aplicação de 20µL nos discos correspondendo a 8 UA e 256 UA por disco

<b>Leveduras</b>		
<i>Candida kefir</i> (efluente)	-	NT
<i>Candida</i> sp. (alimento)	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	-	NT
<i>Malassezia paquidermatis</i> (isolado clínico)	-	NT

---

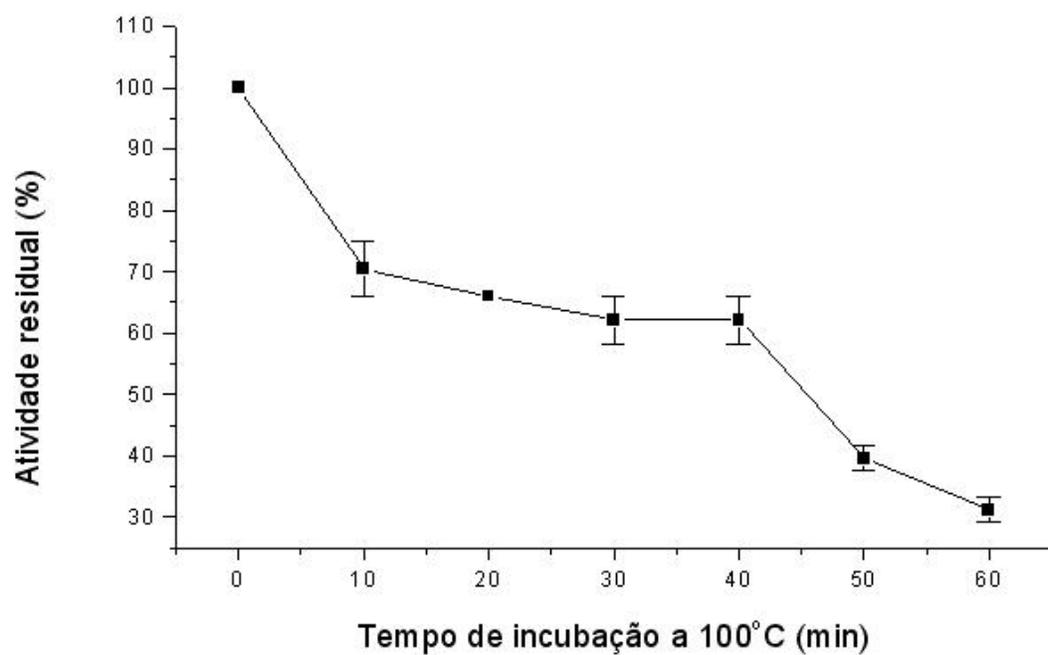
<sup>a</sup> diâmetro ao redor do disco; <sup>b</sup> halos com inibição parcial; - sem inibição; NT não testado

#### 4.5.2 Estabilidade térmica

O extrato bruto mostrou-se estável em todas as temperaturas testadas abaixo de 100° C, mantendo acima de 85% de sua atividade inicial (Tabela 6). No entanto, o extrato bruto não foi tão estável quando incubado a 100° C quando comparado com o trabalho de Korenblum et al. (2005), o qual apresentou substâncias antimicrobianas produzidas por linhagens de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus firmus* que mantiveram a sua atividade antimicrobiana após tratamento a 100° C por uma hora. A substância do presente trabalho perdeu cerca de 40% da sua atividade nos tempos iniciais e 60 a 70% nos tempos finais de incubação a 100° C (Figura 3). Houve perda de 100% da atividade quando autoclavado durante 15 minutos.

**TABELA 6:** Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana do extrato bruto.

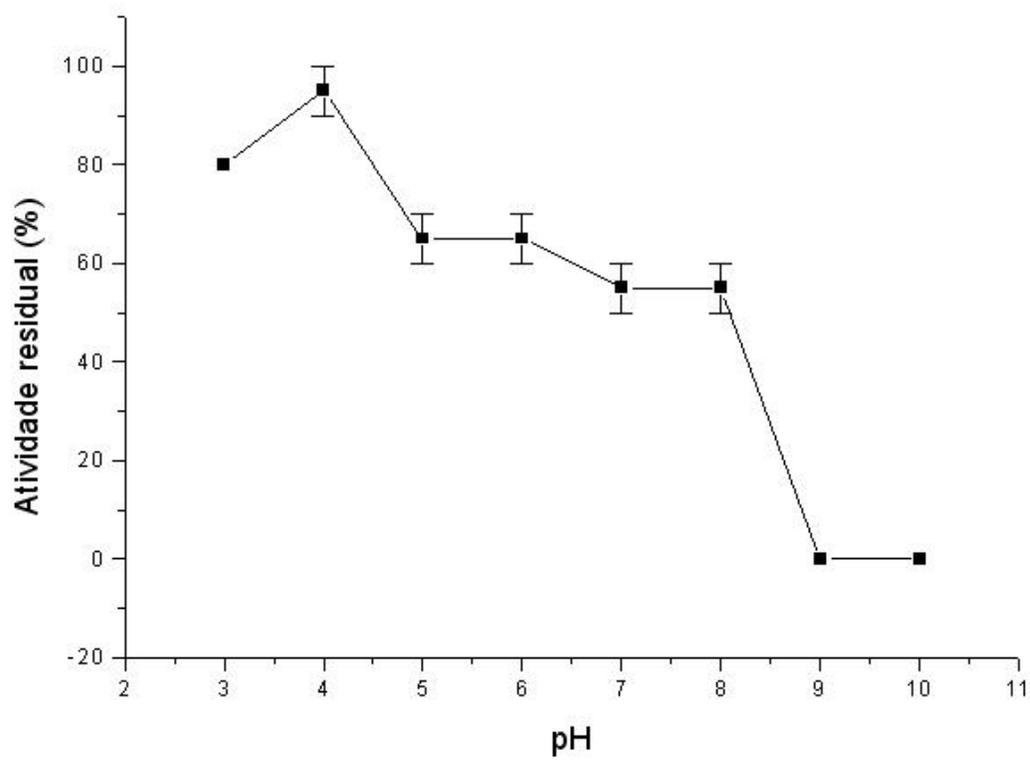
<b>Tratamento</b>	<b>Atividade residual (%)</b>
10° C/ 30 min	96 ± 4
25° C/ 30min	92 ± 8
40° C/ 30 min	91,6
60° C/ 30 min	91,6
80° C/ 30 min	87± 4



**FIGURA 3:** Estabilidade térmica da atividade antimicrobiana a 100° C durante diferentes intervalos de tempo

### 4.5.3 Ação em diferentes pHs

A substância antimicrobiana foi ativa em pHs de 3,0 a 8,0, tendo maior atividade nos pHs mais ácidos como 3,0 e 4,0, no entanto perdeu completamente a sua atividade quando incubado em pHs extremamente alcalinos como 9,0 e 10,0 (Figura 4). No trabalho de Korenblum et al. (2005), a substância antimicrobiana produzida por *B. subtilis* apresentou diminuição da atividade antimicrobiana em pHs alcalinos. No trabalho de Wu et al. (2005), também houve a diminuição da atividade dos dois peptídeos antimicrobianos subpeptina JM4-A e JM4-B, produzidos por *Bacillus subtilis*, quando incubados em pH alcalino (10,0) e de acordo com O'Sullivan et al. (2002), as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, assim como a Nisina, são ativas em pHs baixos e perdem a atividade quando em ambiente alcalino.



**FIGURA 4:** Ação da substância antimicrobiana em diferentes valores de pH.

#### 4.5.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

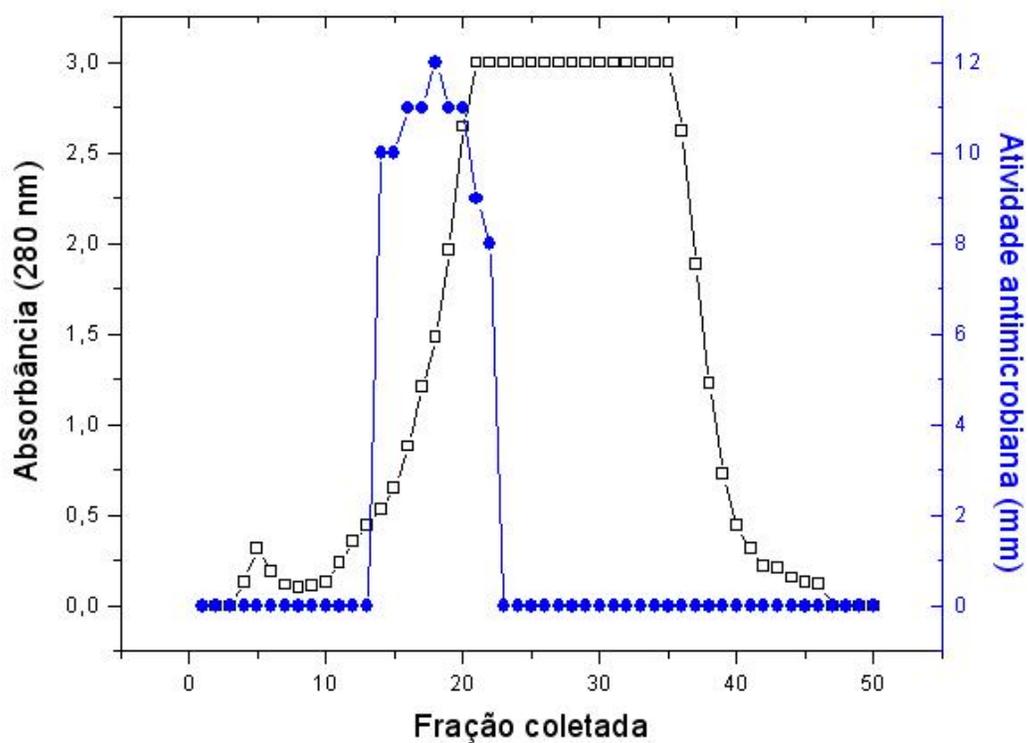
A atividade antimicrobiana do extrato bruto apresentou pouca sensibilidade ao ser tratada com as duas enzimas utilizadas em ambas as concentrações (2 e 10 mg/ mL), enquanto que a substância purificada, mais concentrada, manteve a atividade antimicrobiana inicial.

A ausência de sensibilidade às enzimas testadas não comprova que a substância estudada não tenha natureza protéica, já que de acordo com Stein (2005), os peptídeos antimicrobianos produzidos por *B. subtilis* apresentam estruturas cíclicas com constituintes não usuais, como D-aminoácidos, e são geralmente resistentes à hidrólise por peptidases e proteases. Um exemplo é a subtilosina A, que é um peptídeo cíclico altamente resistente a proteases (Kawulka et al., 2004).

## **4.6 Purificação da substância antimicrobiana**

### **4.6.1 Cromatografia líquida de gel filtração (G-100)**

O extrato liofilizado foi aplicado numa coluna de Sephadex G-100. O resultado é mostrado na Figura 5. Pode-se observar que o pico de atividade coincide com o aumento do nível de proteína, sendo que o maior nível corresponde às proteínas do meio de cultura.



**FIGURA 5:** Perfil de eluição do extrato bruto liofilizado em coluna de gel filtração G-100. A absorbância a 280 nm (□) e a atividade antimicrobiana em mm (●) foram determinadas para cada fração coletada.

#### 4.6.2 Extração com solvente orgânico

Para continuar com o processo de purificação, as frações obtidas no item anterior com atividade antimicrobiana (14 à 20) foram agrupadas e designadas como amostra II. Foi feita extração com n-butanol da amostra II de acordo com o item 3.11.2. A tabela de purificação (Tabela 7) mostra as frações obtidas nos passos da purificação. Pode-se observar que o fator de purificação diminuiu do extrato bruto para a amostra I, tendo ocorrido uma perda da atividade através do processo de liofilização. Da amostra II para a III também ocorreu uma diminuição do fator de purificação, isso porque há a perda da atividade durante o período de evaporação do solvente e ainda novamente no processo de liofilização.

**TABELA 7:** Tabela de purificação mostrando as frações obtidas nos passos de purificação

Fração	A	Vol	AT	Prot	Prot. T	A.E.	F.P.	Y
Ext. Br.	400	20	8000	2,5	50	160	1,0	100
Amostra I	3200	0,72	2304	24,8	17,85	129	0,8	28,8
Amostra II	400	6	2400	0,15	0,9	2666,6	16,6	30
Amostra III	1600	0,07	112	1,83	0,13	861,5	5,38	1,4

Ext. Br., extrato bruto; A, Atividade (UA/mL); Vol, Volume (mL); AT, Atividade total (UA); Prot., Proteína (mg/mL); Prot. T., Proteína Total (mg); A.E., Atividade específica (UA/mg proteína); F.P., Fator de Purificação; Y, Rendimento (%)

## **4.7 Caracterização da amostra III**

### **4.7.1 Estabilidade térmica**

A estabilidade térmica da amostra III foi avaliada incubando a amostra III às temperaturas de 60 e 80°C durante 30 minutos e 100 °C durante 5 e 10 minutos. Pode ser visto na Tabela 8, que a substância antimicrobiana apresentou praticamente o mesmo padrão de estabilidade térmica do extrato bruto, mantendo melhor a atividade em temperaturas abaixo de 100° C.

**TABELA 8:** Estabilidade térmica da amostra III (substância antimicrobiana purificada)

<b>Tratamento</b>	<b>Atividade residual (%)</b>
60° C/ 30 min	87 ± 4
80° C/ 30min	90 ± 3
100° C/ 5 min	77 ± 2
100° C/ 10 min	77 ± 2

#### **4.7.2 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas**

A substância antimicrobiana foi totalmente estável às enzimas testadas, em ambas concentrações de 2 e 10 mg/mL, após os processos de purificação, o que novamente sugere uma estrutura cíclica para a substância.

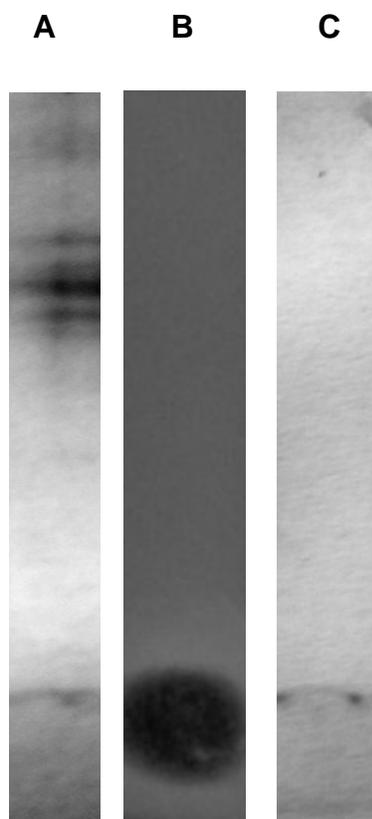
Sendo o antimicrobiano resistente às proteases testadas, foi necessário um outro ensaio para identificar se o antimicrobiano possuía natureza protéica, para isso foi realizado um teste qualitativo de ninidrina.

### **4.7.3 Teste qualitativo de ninidrina**

O teste de ninidrina feito com a amostra III (ressuspendida em 0,5 mL de tampão fosfato) foi positivo indicando que a substância antimicrobiana possui natureza protéica.

### **4.7.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida com as amostras II e III, os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6, onde podemos observar a diferença entre os géis corados da amostra II e III, mostrando a eficácia do passo de purificação de extração com n-butanol. Verifica-se, no gel C, somente uma banda de proteína, que coincidiu com a zona de inibição do gel de atividade. A banda de proteína da amostra III do gel corado apresentou um peso molecular aparente inferior a 5 kDa, que foi determinado através da comparação entre o Rf (mobilidade relativa) da amostra com o Rf de outras proteínas já conhecidas. Observa-se no gel da amostra II, a presença de outras bandas de proteína na região em torno de 40 a 60 kDa, o que não é visto no gel da amostra III.

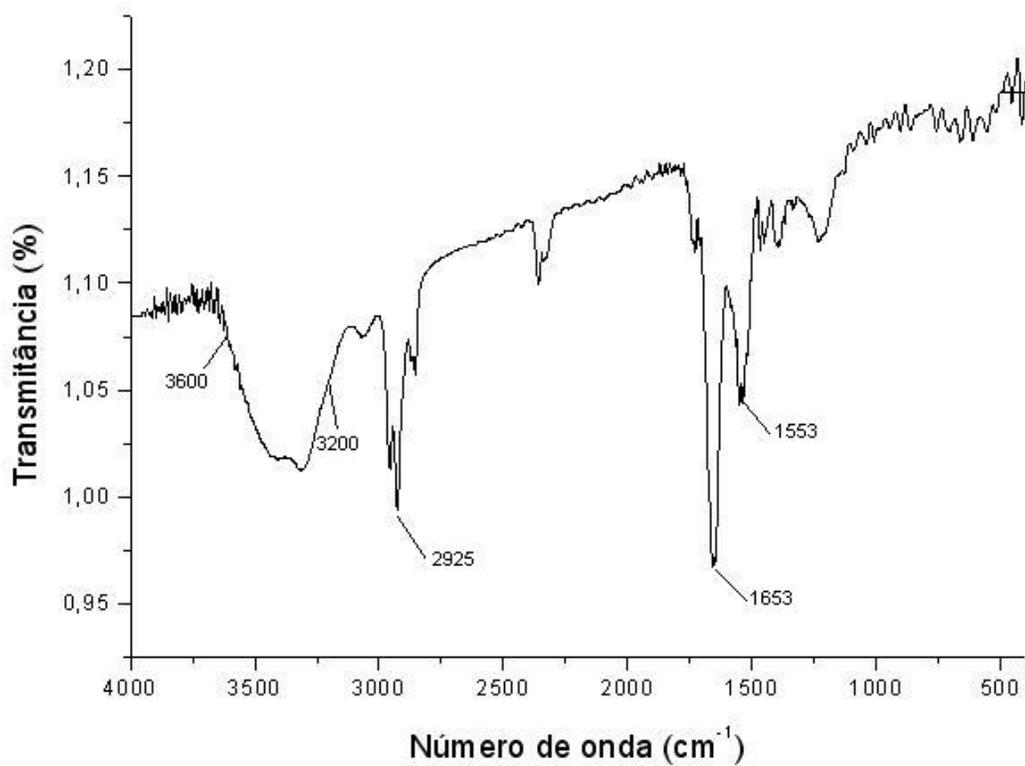


**FIGURA 6:** Gel de poliacrilamida 14% das amostras II e III: A, gel corado com as bandas de proteína da amostra II; B, gel de atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 da amostra II; C, banda de proteína da amostra III.

#### 4.7.5 Espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho da amostra III foi determinado e a Figura 7 apresenta os resultados. Pode-se observar na Figura 7 a existência de uma banda larga entre  $3600$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$ , a qual é característica da função nitrogenada amina. A presença de uma banda de absorção em  $1653\text{ cm}^{-1}$  associada com absorção entre  $3500$  e  $3070\text{ cm}^{-1}$  é indicativa da função amida. A banda em  $1653\text{ cm}^{-1}$  associada, também, com a banda de absorção existente em  $2925\text{ cm}^{-1}$  é indicativa do grupo funcional ácido carboxílico (Wilson & Fascio, 2004), ou seja, a presença do grupo carboxilo  $\text{—COOH}$  e o grupo amina  $\text{—NH}_2$  indicam a presença de aminoácidos, conseqüentemente a presença de proteínas. As duas bandas espectrais proeminentes presentes na região entre  $1800$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , de acordo com Fabian et al. (1993) são: banda de amida I centrada em torno de  $1652\text{ cm}^{-1}$  e a banda de amida II em  $1553\text{ cm}^{-1}$ . A primeira surge da vibração de estiramento da cadeia do grupo  $\text{C=O}$  e a segunda devido à vibração da ligação  $\text{N—H}$  fortemente ligada ao estiramento da ligação  $\text{C—N}$ .

A absorção localizada na região entre  $1600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  aparece, principalmente, devido à vibração do estiramento do grupamento carbonila das ligações peptídicas (Gaussier et al., 2003)

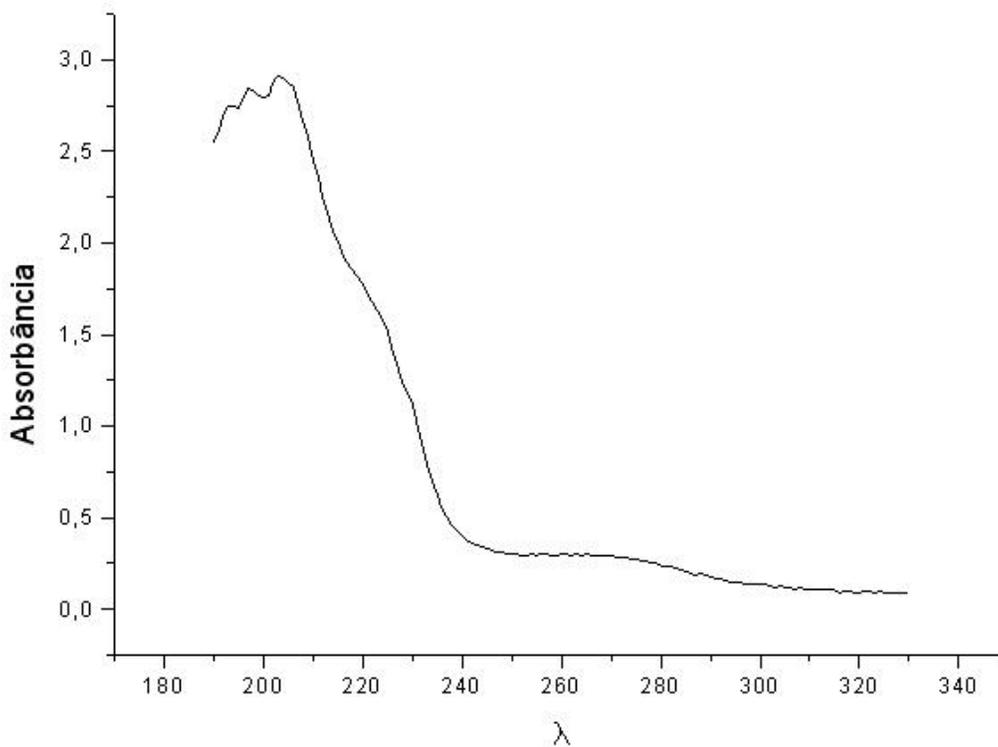


**FIGURA 7:** Espectro de infravermelho da amostra III

#### 4.7.6 Espectroscopia de ultravioleta

A Figura 8 mostra que não houve alta absorbância em torno de 300 nm e alto sinal de absorbância foi observado em comprimentos de onda menores que 200 nm, típico da absorção de proteínas. O “ombro” presente em aproximadamente 220 nm é característico da absorção de ligações peptídicas.

**FIGURA 8:** Espectro de ultravioleta da amostra III



#### **4.8 Curva dose-resposta contra *Listeria monocytogenes***

Foram utilizadas concentrações de 3 a 200 UA/mL da substância antimicrobiana contida no extrato bruto da cultura da bactéria produtora. Pode-se observar na Tabela 9, que uma dose baixa da substância antimicrobiana, de 25 UA/mL, já mantém a contagem inicial de  $10^6$  UFC/mL de *L. monocytogenes*, no entanto com nenhuma das concentrações testadas ocorreu a morte/lise celular da espécie indicadora em questão, permanecendo pelo menos a contagem inicial de *L. monocytogenes*. Na faixa de 50 a 400 UA/mL do antimicrobiano praticamente não ocorreu diferença na diminuição na contagem de *L. monocytogenes*. O efeito de bacteriocinas sobre as células alvo pode ser bacteriostático, bactericida ou bacteriolítico. Este efeito pode ser influenciado por diversos fatores como concentração da bactericina, concentração da bactéria indicadora, meio de cultivo e grau de pureza da bacteriocina (Boucabeille et al. 1997; Motta & Brandelli 2002). O peptídeo antimicrobiano produzido por *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 apresentou um efeito bacteriostático contra  $10^6$  UFC/mL de *L. monocytogenes*.

**TABELA 9:** Comportamento de *L. monocytogenes* tratada com diferentes concentrações da substância antimicrobiana. Concentração inicial de *L. monocytogenes*:  $10^6$  UFC/ MI

<b>Concentração final do extrato bruto (UA/mL)</b>	<b>Contagem de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (UFC/mL)</b>
0	$5 \times 10^6$
6,25	$3 \times 10^6$
12,5	$2 \times 10^6$
25	$9 \times 10^5$
50	$8 \times 10^5$
100	$7 \times 10^5$
200	$6 \times 10^5$
400	$6 \times 10^5$

## 5. CONCLUSÕES

A bactéria do presente trabalho foi identificada como pertencente à espécie *Bacillus amyloliquefaciens*.

Foi possível verificar que a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 produz uma substância antimicrobiana de amplo espectro de ação, inibindo tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, incluindo importantes patógenos. Uma baixa concentração da substância antimicrobiana foi capaz de manter o número de células viáveis de *Listeria monocytogenes*, demonstrando uma ação bacteriostática contra  $10^6$  UFC/mL do patógeno.

A purificação da substância foi possível por meio de gel filtração e extração com o solvente orgânico butanol.

A natureza protéica da substância foi confirmada pelo teste da ninidrina, espectroscopia de infravermelho e ultravioleta. A resistência às proteases pode ser devido a uma possível estrutura cíclica do antimicrobiano. A substância possui peso molecular em torno de 5 kDa

Houve maior ação antimicrobiana no extrato bruto da cultura incubada durante 48 horas a 37° C, comparada com o extrato da cultura incubada durante

24 horas. E a curva de crescimento da bactéria e produção do antimicrobiano indicaram que o antimicrobiano é um metabólito secundário.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se verificar que a substância produzida pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 é um peptídeo antimicrobiano que provavelmente é produzido na fase estacionária de crescimento da bactéria produtora. O antimicrobiano produzido pelo isolado LBM 5006 possui características, incluindo a facilidade de purificação, que indicam o seu ótimo potencial para ser utilizado no combate de vários microrganismos patogênicos para humanos e plantas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN, M. et al. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.220, n.1, p.127-131, mar 2003.

ANADÓN, A. et al. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the safety of the product “Kemzyme W Dry” regarding the ability of *Bacillus* strains involved in the manufacture to produce toxins. **The EFSA Journal**, [S.l.], v.118, p.1-4, 2004.

ARANHA, C.; GUPTA, S.; REDDY, K.V. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. **Contraception**, Los Altos, v.69, n.4, p.333-338, apr 2004.

ARVIZU-MEDRANO, S.M.; ESCARTIN, E.F. Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* in acidified media. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.10, p.2047-2053, oct 2005.

BAX, R.P. et al. Antibiotic resistance--what can we do? **Nature medicine**, Nova York, v.4, n.9, p.545-546, sep 1998.

BIZANI, D. et al. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **International Microbiology**, Barcelona, v.8, n.2, p.125-131, jun 2005.

BONKOWSKI, M.; ROY, J. Soil microbial diversity and soil functioning affect competition among grasses in experimental microcosms. **Oecologia**, Berlim, Nova York, v.143, n.2, p.232-240, mar 2005.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.7, p.2647-2653, 1997.

BOUCABELLE, C. et al. Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.153, n.2, p.295-301, aug 1997.

BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Effect of chelators and nisin in situ on inhibition and inactivation of Gram-negatives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.53, n.2-3, p.105-113, dec 1999.

BURJANEK, L.L.; YOUSEF, A.E. 197 Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.31, n.3, p.193-197, sep 2000.

CETINKAYA, S. et al. Bacteriocin diversity in *Bacillus sphaericus*. **Folia Microbiologica**, Praha, v.48, n.2, p.157-161, 2003.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.2, p.82-100, 2003.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, n.1, p.1-20, dec 2001.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v.3, n.10, p.777-788, oct 2005.

CURTIS, P.; SLOAN, W.T. Microbiology. Exploring microbial diversity. **Science**, Washington, v.309, n.5739, p.1331-1333, aug 2005.

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. **Current Drug Targets**, Hilversum, v.3, n.2, p.107-122, apr 2002.

FABIAN, H. et al. Secondary structure and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T<sub>1</sub> in aqueous solution. **Journal of Molecular Biology**, Nova York, v.232, n.3, p.967-981, aug 1993.

FEDERAL REGISTER (USA).GRAS or prior-sanctioned ingredients: Carbohydrase and protease enzyme preparation derived from *Bacillus subtilis* or *Bacillus amyloliquefaciens*. **Rules and Regulation**, [S.I.] v.64, n.78, p.19887-19895, apr 1999.

FIMLAND, G. et al. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v.11, n.11, p.688-696, nov 2005.

FLAMM, R.K et al. Introduction of pAM $\beta$ 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. **Infection and immunity**, Washington, v.44, p.157-161, 1984.

FONBERG-BROCZEK, M. et al. High pressure processing for food safety. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.52, n.3, p.721-724, 2005.

FRENCH, G.L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.57, n.10, p.1514-1527, jul 2005.

FREY, P. et al. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.473-479, feb 1996.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase (part I) Isolation of bacteria secreting potent amylase and their distribution. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Osaka, v.19, p.487-503, 1943.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. **Science**, Washington, v.309, n.5739, p.1387-1390, aug 2005.

GAUSSIER, H. et al. Conformational changes of pediocin in an aqueous medium monitored by Fourier transform infrared spectroscopy: a biological implication. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.32, n.1-2, p.1-9, mar 2003.

GEBHARDT, K. et al. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.217, n.2, p.199-205, dec 2002.

GILLER, P.S. The diversity of soil communities the “poor man’s tropical rain forest”. **Biodiversity and Conservation**, Londres, v.5, n.2, p.135-168, 1996.

GOLDSTEIN, B.P. et al. Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, Nova York, v.42, n.2, p.277-278, aug 1998.

GOMEZ, N. et al. Modelling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields in media of different pH. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.103, n.2, p.199-206, aug 2005.

GRANDE, M.J. et al. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. **International Journal of Food microbiology**, Amsterdam, v.106, n.2, p.185-194, feb 2006.

HAMES, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS. Oxford: [s.n.]. 1981. p.1-92.

HANCOCK, R.E.W.; CHAPPLE, D.S. Peptide Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, n.6, p.1317-1323, jun 1999.

HASTINGS, J.W. et al. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.173, n.23, p.7491-7500, dec 1991.

HÉCHARD, Y. et al. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of General Microbiology**, Inglaterra, v.138, n.12, p.2725-2731, dec 1992.

IZADPANA, A.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.52, n.3 pt 1, p.381-390, mar 2005.

JENSEN, J. B. Research on the quantitative determination of solids by infrared spectroscopy & the potassium bromide disk technic. **Dansk tidsskrift for farmaci**, Denmark, v.32, n.11, p.205-220, nov 1958.

KAMOUN, F. et al. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.98, n.4, p.881-888, 2005.

KATZ, E.; DEMAIN, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriological Reviews**, Washington, v.41, n.2, p.449-474, jun 1977.

KAWULKA, K.E. et al. Structure of Subtilisin A, a Cyclic Antimicrobial Peptide from *Bacillus subtilis* with Unusual Sulfur to alpha-Carbon Cross-Links: Formation and Reduction of alpha-Thio-alpha-Amino Acid Derivatives. **Biochemistry**, Washington, v.43, p.3385-3395, 2004.

KIMURA, H. et al. Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals New York Academy of Sciences**, Nova York, v.864, p.345-348, dec 1998.

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

KLIRONOMOS, J.N. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. **Nature**, Londres, v. 417, p.67-70, may 2002.

KORENBLUM, E. et al. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H<sub>2</sub>O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.98, n.3, p.667-675, mar 2005.

KRUSZEWSKA, D. et al. Mersacidin eradicates methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, Nova York, v.54, n.3, p.648-653, sep 2004.

LANENNPAA, M. et al. Prevention of flower development in birch and other plants using a pFULL1::BARNASE construct. **Plant Cell Reports**, Berlim, Nova York, v.24, n.2, p.69-78, may 2005.

LEE, K.H. et al. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.3, p.146-151, mar 2001.

LOHNER, K.; PRENNER, E.J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimic systems. . **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1462, n.1-2, p.141-156, dec 1999.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, n.1, p.265-275, nov 1951.

MARSHALL, S.H.;ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso v.6, n.2, p.271-284, aug 2003.

MARTINEZ, B. et al. Consequences of the development of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, n.11, p.2383-2388, nov 2005.

MCELHANEY, R. N.; PRENNER, E. J. The interaction of antimicrobial peptides with model lipid bilayer and biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v.1462,p.1-234, 1999.

MENDO, S. et al. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. **Biotechnology Letters**, Kew, v.26, n.2, p.115-119, jan 2004.

MEYRANDA, A. et al. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.85, n.3, p.537-544, sep 1998.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.1, p.63-70, 2002.

NIU, W.W.; NEU, H.C. Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.35, n.5, p.998-1000, may 1991.

O'SULLIVAN, L. et al. Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.100, n.1, p.135-143, 2006.

O'SULLIVAN, L. et al. Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, v.84, n.5-6, p.593-604, 2002.

OKEKE, I.N. et al. - Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. **The Lancet Infectious diseases**, Nova York, v.5, n.8, p.481-493, aug 2005.

OLIVEIRA,S.S.et al. Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.27, n.5, p.287-291, nov 1998.

OVERBYE, K.M.; BARRETT, J.F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, Kidlington, Oxford, v.10, n.1, p.45-52, jan 2005.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, Oxford, Nova York, v.21, n.6, p.465-499, sep 2003.

PÉROMBELON, N.; KELMAN. Ecology of the soft rot *Erwinia*. **Annual Review in Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.361-387, 1980.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food microbiology**, Amsterdam, v.87, n.3, p.207-216, nov 2003.

POROS-GLUCHOWSKA, J.; MARKIEWICZ, Z. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. **Acta Microbiologica Polonica**, Polônia, v.52, n.2, p.113-129, mar 2003.

PRENNER, E.J.; LEWIS, R.N.; MCELHANEY, R.N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1462, n.1-2, p.201-221, dec 1999.

PRIEST, F.G. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. ver. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.37, p.69-71, 1987.

PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriology Reviews**, [S.I.], v.41, n.3, p.711-753, sep 1977.

REDDY, K.V. et al. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. **Reproduction**, Cambridge, v.128, n.1, p.117-126, jul 2004.

ROSS, A.I. et al. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. **International Journal of Food microbiology**, Amsterdam, v.89, n.2-3, p.125-138, dec 2003.

RUSSEL, N.J. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food microbiology**, Amsterdam, v.79, n.1-2, p.27-34, nov 2002.

RYAN, M.P. et al. The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.82, n.10, p.2108-2114, oct 1999.

SCHALLMEY, M et al. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.1, p.1-17, 2004.

SCHÜGERL, K. Integrated processing of biotechnology products. **Biotechnology Advances**, Oxford, Nova York, v.18, n.7, p.581-599, nov 2000.

SHELDON, A.T. Jr. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, Washington, v.18, n.3, p.170-180, 2005.

SLEPECKY, R.A.; HEMPHILL, H.E. The genus *Bacillus* – nonmedical. In: THE PROKARYOTES: A Handbook on the Biology of Bacteria. 2nd ed. Nova York: [s.n.], 1992. p.1663-1696.

SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkin, 1986. v.2.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.56, n.4, p.845-857, 2005.

SUBBALAKSHMI, C.; SITARAM, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.160, n.1, p.91-96, mar 1998.

SUFFREDINI, I.B. et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.37, n. 3, p.379-384, mar 2004.

SÜSSMUTH, R.D.; WOHLLEBEN, W. The biosynthesis of glycopeptide antibiotics- a model for complex, non-ribosomally synthesized, peptidic secondary metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, Nova York, v.63, n.4, p.344-350, jan 2004.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bactcriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington, v.40, n.3, p.722-756, 1976.

THENNARASU, S. et al. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v.137, n.1-2, p.38-51, oct 2005.

THOMPSON, J.D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap

penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, Londres, v.22, n.22, p.4673-4680, nov 1994.

82

TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. **Lactic acid bacteria in beverages and food**, Londres, p.177-191, 1975

TWOMEY, D.P. et al. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, n.9, p.1981-1988, sep 2000.

VALVERDE, J.M. et al. Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.20, p.7807-7813, oct 2005

VAN DER HEIJDEN, M.G.A. et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant diversity ecosystem variability and productivity. **Nature**, Londres, v.396, p.69-72, 1998.

VIGNOLO, G. et al. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. **Current Microbiology**, Nova York, v.41, n.6, p.410-416, dec 2000.

VON BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.295, n.6-7, p.355-512, oct 2005.

WALSH, D. et al. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.90, n.4, p.517-522, apr 2001.

WELKER, N.E.; CAMPBELL, L.L. Comparison of the  $\alpha$ -Amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.94, n.4, p.1131-1135, oct 1967.

WILSON, A.L.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.4, p.670-673, 2004.

WU, S. et al. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. **Current Microbiology**, Nova York, v.51, n.5, p.292-296, oct 2005.

XU, D.; CÔTÉ, J.C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S

ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, n.pt3, p.695-704.

83

YANAGIDA, F. et al. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.40, n.6, p.430-435, jun 2005.

YOSHIDA, S. et al. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. **Biological Control**, San Diego, v.91, n.2, p.27-33, 2001.

ZHANG, Q. et al. Increased Production of  $\alpha$ -Amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of Glycine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.1, p.293-295, jul 1983.

## 7. APÊNDICE

**Apêndice 1:** Sequências da região ribossomal 16S dos DNAs de espécies de *Bacillus* utilizadas para a análise filogenética.

<b>Espécies</b>	<b>Número de acesso no GenBank</b>
<i>Bacillus cereus</i>	gi 457636
<i>Bacillus anthracis</i>	gi 39332
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	gi 2331222
<i>Bacillus thuringiensis</i>	gi 457643
<i>Bacillus mycooides</i>	gi 7209539
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	gi 7209546
<i>Bacillus halmapalus</i>	gi 498807
<i>Bacillus cohnii</i>	gi 498797
<i>Bacillus flexus</i>	gi 7209532
<i>Bacillus megaterium</i>	gi 457650
<i>Bacillus simplex</i>	gi 1101608
<i>Bacillus marinus</i>	gi 7209537
<i>Bacillus sphaericus</i>	gi 457642
<i>Bacillus fusiformis</i>	gi 1209244
<i>Bacillus psychrophilus</i>	gi 457639

<b>Espécies</b>	<b>Número de acesso no GenBank</b>
<i>Bacillus globisporus</i>	gi 312030

85

**Apêndice 1:** Continuação - Sequências da região ribossomal 16S dos DNAs de espécies de *Bacillus* utilizadas para a análise filogenética.

<b>Espécies</b>	<b>Número de acesso no GenBank</b>
<i>Bacillus pasteurii</i>	gi 39726
<i>Bacillus insolitus</i>	gi 39498
<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	gi 7209542
<i>Bacillus niacini</i>	gi 7209541
<i>Bacillus azotoformans</i>	gi 1088402
<i>Bacillus circulans</i>	gi 1088405
<i>Bacillus benzoovorans</i>	gi 1088404
<i>Bacillus firmus</i>	gi 39476
<i>Bacillus lentus</i>	gi 7209536
<i>Bacillus fastidious</i>	gi 39469
<i>Bacillus pumilus</i>	gi 39772
<i>Bacillus licheniformis</i>	gi 312031
<i>Bacillus atrophaeus</i>	gi 7209528
<i>Bacillus mojavenensis</i>	gi 7209538
<i>Bacillus subtilis</i>	gi 40244
<i>Bacillus vallismortis</i>	gi 7209545
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	gi 39326
<i>Bacillus methanolicus</i>	gi 297069
<i>Bacillus oleronius</i>	gi 732567
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	gi 1220197

*Bacillus carboniphilus*

gi|7209529|

*Bacillus badius*

gi|456616|

*Bacillus smithii*

gi|511104|

---