

ELSA CRISTINA VIEIRA DE SOUSA

Purificação e Caracterização de Moléculas
com Atividade Antibacteriana Produzidas
por Bactérias do Género *Bacillus*.



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2013

Nome: Elsa Cristina Vieira de Sousa

Título: Purificação e Caracterização de Moléculas com Atividade Antibacteriana Produzidas por Bactérias do Género *Bacillus*.

Orientadores: Doutora Carla Mendes Cabral

Doutor Duarte Toubarro

Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Biomédicas, apresentada à Universidade dos Açores.



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2013

AGRADECIMENTOS:

A realização deste trabalho, só foi possível com a cooperação de diversas pessoas, a todas as que contribuíram direta ou indiretamente para a sua realização, gostaria de expressar o mais profundo e sincero agradecimento.

- Á Professora Doutora Carla Mendes Cabral, orientadora deste trabalho, um agradecimento muito especial. Agradeço a disponibilidade constante, a paciência e os conhecimentos transmitidos durante o processo de orientação científica da dissertação. Foi um privilégio ser sua orientanda, e as suas orientações em todas as etapas foram cruciais para a concretização deste trabalho. Por todo o conhecimento que transmitiu e todo o tempo disponibilizado, expresso desta forma um sincero agradecimento.
- Ao Doutor Duarte Toubarro, orientador deste trabalho, um agradecimento muito especial. Agradeço a disponibilidade para me apoiar e ajudar em diversas etapas deste trabalho e também todo o conhecimento transmitido. Foi um prazer ser sua orientanda, expresso um sincero agradecimento.
- Ao Professor Doutor Nelson Simões, diretor do Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN), em cujos laboratórios decorreu todo o trabalho de investigação.
- Aos Técnicos Alexandra e Pedro, pelo apoio que prestaram no trabalho de laboratório.
- Ao Paulo, queria agradecer todo o apoio que me deu durante estes meses de árduo trabalho. Um muito obrigado.
- Quero agradecer aos meus pais e irmãos, que apesar de estarem longe, sempre me apoiaram nesta etapa da minha vida. Muito obrigado

ÍNDICE

Resumo:.....	5
Abstract:	5
1. Introdução	7
1.1. Bacteriocinas	7
1.1.1-Classificação das bacteriocinas LAB	10
1.1.2-Bacteriocinas Gram positivas e Gram negativas	14
1.2 Bacteriocinas produzidas por <i>Bacillus</i>	15
1.2.1- <i>Bacillus cereus</i>	19
1.2.1- <i>Bacillus mycoides</i>	20
1.3- Aplicações das bacteriocinas do género <i>Bacillus</i>	20
1.3.1- Aplicações na Saúde humana	20
1.3.2- Aplicações na Saúde Animal	23
1.3.3- Aplicações ambientais.....	23
1.3.4- Aplicações alimentares.....	24
2. Pertinência e Objectivos do trabalho	27
3. Material e Métodos	28
3.1-Meios de cultura	28
3.2-Culturas bacterianas	28
3.3-Recuperação dos isolados	29
3.4-Estudo das condições de crescimento	30
3.5-Atividade antibacteriana dos isolados S54c e S150c.....	30
3.6-Preparação dos sobrenadantes das culturas bacterianas.....	31
3.7-Teste da atividade antimicrobiana	32
3.8-Concentração e fracionamento	33
3.9-Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas.....	33
3.10-Purificação parcial S54c.....	34
3.11- SDS-PAGE.....	35
3.12-Amplificação e sequenciação de um fragmento do gene 16S do isolado S54c	36
3.12.1-Extração do DNA.....	36
3.12.2- Condições de amplificação do fragmento 16S.....	36
3.12.3- Eletroforese em Gel de Agarose.....	37

3.12.4- Purificação do produto de PCR.....	37
3.12.5- Sequenciação do DNA e análise.....	38
4. Resultados e Discussão	39
4.1-Estudo das condições de crescimento	39
4.2 –Atividade antibacteriana dos isolados S54c e S150c	42
4.3- Concentração e fracionamento.....	43
4.4- Espectro de atividade do isolado S54c.....	44
4.5-Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas.....	46
4.6- Purificação parcial.....	50
4.7- SDS-PAGE.....	52
4.8- Amplificação e sequenciação de um fragmento do gene 16S do isolado S54c.....	52
5. Conclusões gerais	54
6. Referências bibliográficas	56
Anexos	60
Anexo I.....	60
Anexo II.....	61
Anexo III.....	62
Anexo IV.....	63

RESUMO:

As bactérias produzem várias substâncias antibacterianas desde antibióticos, lisozimas, exotoxinas e também bacteriocinas. As bacteriocinas são péptidos antimicrobianos de síntese ribossomal que têm suscitado um interesse crescente no combate a estirpes resistentes a antibióticos. Algumas espécies de *Bacillus* produzem bacteriocinas/BLIS que possuem ação contra MRSA e outras estirpes resistentes. As aplicações das bacteriocinas vão desde a Saúde Humana até à utilização como bioconservantes. O objetivo deste trabalho foi o estudo e caracterização da atividade antibacteriana de 2 isolados de *Bacillus* (S54c e S150c) da Coleção Açoriana de Bactérias Esporulantes, bem como das suas moléculas ativas. Os dois isolados mostraram maior crescimento e maior atividade antibacteriana em meio *Brain Heart Infusion* após 18 horas de incubação. Para o sobrenadante filtrado destes isolados e para as frações ativas do sobrenadante do isolado S54c foi determinada a estabilidade térmica e a sensibilidade a enzimas hidrolíticas. O resultado destes testes foi avaliado pela determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar contra a bactéria *Micrococcus luteus*. A atividade dos isolados S54c e S150C contra *Staphylococcus aureus* e MRSA foi avaliada pelo método descrito para bactérias esporulantes e o espectro de atividade do sobrenadante do isolado S54c foi determinado. O sobrenadante liofilizado do isolado S54c foi fracionado por cromatografia de exclusão molecular, coluna *Sephacryl S-200* 40 ml, e as frações positivas visualizadas em SDS-PAGE. Os sobrenadantes dos isolados S54c, S150c e a fração >30kDa do sobrenadante do isolado S54c possuem estabilidade térmica até aos 100°C, a fração entre os 3-30kDa do isolado S54c é estável até aos 121°C. Mostrou-se que a atividade antibacteriana dos isolados S54c, S150c e a fração >30kDa (S54c) é hidrolisada pela proteinase K e quimiotripsina, enquanto a fração entre os 3-30 kDa(S54c) apenas é hidrolisada pela proteinase K. Os resultados obtidos indicam que a atividade antibacteriana é de origem proteica e permitem classificar estas moléculas como BLIS. Os isolados S54c e S150c mostraram atividade contra *S.aureus* e MRSA, contudo o S150c apresentou uma atividade mais reduzida. O sobrenadante filtrado do isolado S54c mostrou atividade contra *M.luteus* e *B.cereus* e o fracionamento em cromatografia de exclusão molecular resultou na identificação de uma fração ativa. A análise da sequência parcial do gene 16S mostrou que o isolado S54c é uma estirpe de *B.cereus*. Este trabalho permitiu identificar parcialmente BLIS produzidas por *B.cereus* S54c e que podem vir a ser purificadas por técnicas cromatográficas.

Palavras Chave: *Bacillus*, Bacteriocina, *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS), Atividade antibacteriana.

ABSTRACT:

Bacteria produce a high number of antibacterial molecules, including antibiotics, lisozimas, exotoxinas and bacteriocins. Bacteriocins are antimicrobial peptides of ribosomal synthesis that are raising a growing interest in the fighting against bacteria resistant strains. Some species of *Bacillus* produce bacteriocins/BLIS active against MRSA and other resistant strains. Bacteriocin applications are vast, from human health to biopreservatives. The objective of this work was the study and characterization of antibacterial activity of two *Bacillus* isolates (S54c and S150c) from the Azorean Sporulated Bacteria Collection. The two isolates showed improved growth and higher antibacterial activity in Brain Heart Infusion broth after 18 hours incubation. The antibacterial activity, of the cell free supernatant of both isolates and active fractions of S54c, were evaluated for thermal stability and degradation by hydrolytic enzymes. The results of these testes were evaluated by the agar well diffusion assay against *Micrococcus luteus*. S54c and S150c were tested against *Staphylococcus aureus* and MRSA by the method used for sporulating bacteria and the activity range of S54c cell free supernatant was determined. The freeze dried cell free supernatant of S54c was fractioned by Gel Filtration Chromatography (Sephacryl S-200 40 ml) and positive fractions were separated by SDS-PAGE. The antibacterial activity of S54c and S150c cell free supernatants and the S54c >30kDa fraction showed thermal stability until 100°C. The S54c 3-30kDa fraction proved to be stable at 121°C. The activity of S54c, S150c and S54c >30kDa fraction, is hydrolysed by proteinase K, chymotripsin while the 3-30 kDa(S54c) fraction is hydrolysed only by proteinase K. The results show that antibacterial activity is of protein nature and allow classifying these molecules as BLIS. The S54c and S150c isolates showed activity against *S. aureus* and MRSA, but S150c showed lower activity. The cell free supernatant of S54c showed activity against *M. luteus* and *B. cereus* and the gel filtration chromatography of the freeze dried cell free supernatant resulted in the identification of an active fraction. The analysis of the partial sequence of the 16S gene showed that S54c is a strain of *B. cereus*. This work allowed the partial fractioning and identification of BLIS produced by *B. cereus* S54c that can be purified by applying chromatographic techniques.

Key Words: *Bacillus*, Bacteriocin, Bacteriocin-like substance (BLIS), Antibacterial activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bacteriocinas

As bactérias possuem um sistema de defesa peculiar. Produzem desde antibióticos, como a garamicina e valionomicina, que são sintetizados por complexos multienzimáticos e são utilizados na Saúde Humana e Animal; lisozimas, encontradas em diversos alimentos; exotoxinas e bacteriocinas, que são proteínas ativas com capacidade bacteriocida (Riley & Wertz, 2002).

As bacteriocinas são péptidos antimicrobianos sintetizadas no ribossoma e que têm a capacidade de eliminar bactérias proximamente relacionadas (Aunpad & Na-Bangchang, 2007). Devido ao seu potencial de aplicação como conservante natural, um elevado número de bacteriocinas têm vindo a ser identificadas e caracterizadas, principalmente aquelas produzidas por bactérias lácticas (LAB) (Aunpad & Na-Bangchang, 2007).

Estes péptidos antimicrobianos são encontrados em múltiplos organismos vivos, desde procariotas, plantas e animais (vertebrados e invertebrados). Possuem diversas estruturas químicas e o seu papel na imunidade inata é essencial. Estes péptidos são geralmente pequenos (3-10 kDa) e são inativados por enzimas proteolíticas. Sabe-se, também, que numa única bactéria, podem ser produzidos diversos péptidos com estas características. As bactérias sob condições nutricionais escassas podem ser sujeitas a cenários de competição até mesmo com microrganismos filogeneticamente relacionados. Consequentemente, estudar estes péptidos antimicrobianos torna-se de grande interesse para a comunidade científica, porque são considerados seguros quer para a saúde humana quer para a animal (Lee & Kim, 2011).

Sabe-se que as primeiras bacteriocinas descritas foram as colicinas em 1925, estas são produzidas por *Escherichia coli*. De entre as colicinas, podemos encontrar duas linhagens evolutivas, distintas pelo modo primário de eliminar outras bactérias, sendo que uma induz a formação de poros nas membranas e outra utiliza a atividade de nucleases (Riley & Wertz, 2002). Contudo, atualmente as bacteriocinas mais produzidas e estudadas são a nisina (*Lactococcus lactis*) e subtilina (*Bacillus subtilis*) (Lee & Kim, 2011; Schulz *et al*, 2003).

As bacteriocinas são produzidas em quase todas espécies bacterianas examinadas até hoje e a grande maioria são distintas umas das outras. Sabe-se também que 99% das bactérias existentes produzem bacteriocinas (Riley & Wertz, 2003).

O grupo *Archea* produz uma família distinta de *bacteriocin-like antimicrobials*. Por exemplo, para a *Halobacteria* foram descritas algumas Halocinas. A primeira halocina a ser descoberta foi a S8, é composta por um pequeno péptido hidrofóbico com 36 aminoácidos. Encontra-se codificada num megaplasmídeo e é extremamente resistente a diversas condições do meio. Contudo, o mecanismo de ação e a imunidade para a halocina H6 são os únicos conhecidos, funciona como inibidor antiporte (Na^+/H^+) (Riley & Wertz, 2003).

Como se constata, estes microrganismos investem muita energia na produção e elaboração dos mecanismos antimicrobianos. Por outro lado, não se compreende muito sobre como apareceu esta enorme diversidade e qual o papel destes mecanismos nas comunidades bacterianas (Riley & Wertz, 2003).

Segundo alguns estudos, as bacteriocinas mais conhecidas são sintetizadas na forma de pré-péptidos, com uma sequência N-terminal que conduz o seu transporte para o exterior da célula. Os péptidos sofrem modificações pós-tradução. Estas modificações podem incluir, desidratação de resíduos de serina e/ou treonina, o que resulta na

formação de 2,3 – dideidroaminoácidos; adição de grupos tióis às ligações duplas dos aminoácidos, o que resulta em resíduos de lantionina e β -metil lantionina (Schulz *et al*, 2003).

Naturalmente as bacteriocinas podem variar quanto à sua atividade, depende da espécie bacteriana sensível e o ambiente em que se encontram. Estas podem ter um efeito bactericida sem lise celular, com lise celular ou com efeito apenas bacteriostático (Schulz *et al*, 2003).

Nas últimas décadas tem-se discutido a aplicação das bacteriocinas, bem como a sua evolução e ecologia (Riley & Wertz,2002). As principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos são:

- Modo de produção – os antibióticos são sintetizados por enzimas enquanto as bacteriocinas tem uma síntese ribossomal;
- Fase de produção – os antibióticos são produzidos no metabolismo secundário e as bacteriocinas no metabolismo primário;
- Mecanismo de ação – os antibióticos possuem diversos mecanismos de ação enquanto algumas das bacteriocinas mais conhecidas atuam a nível da membrana citoplasmática;
- Aplicação clínica – os antibióticos têm uma vasta aplicação clínica, já as bacteriocinas, por enquanto, não têm esse tipo de aplicação.
- Ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano - os antibióticos não são degradados, por outro lado as bacteriocinas podem ser degradadas (Riley & Wertz,2002; Montville & Chen, 1998).

1.1.1- Classificação das bacteriocinas LAB

As bactérias lácticas são conhecidas por produzirem bacteriocinas. A pesquisa do uso destas bacteriocinas como conservantes alimentares tem sido de grande importância. Estas são utilizadas na produção de alimentos fermentados, e podem apresentar antagonismo até com outras bactérias do mesmo género. Acredita-se que estas bactérias podem ter efeitos benéficos para a saúde, daí estes alimentos serem denominados probióticos (McMullen & Stiles, 1996).

A sua aplicação como conservantes de alimentos também foi muito estudada, levando à deteção de compostos que originam a antibiose, como as bacteriocinas (Rosa & Franco). A partir de 1990 a pesquisa e utilização destas bacteriocinas aumentou drasticamente (Eijsink *et al*, 2002).

Podemos classificar as bacteriocinas das LAB em quatro classes, que diferem nos seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. A maioria destas bacteriocinas têm uma massa molecular entre os 3 e 10 kDa, possuem um ponto isoelétrico elevado e contêm regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (Schulz *et al*, 2003).

Foi proposto por Klaenhammer (**tabela 1**), baseado na sua estrutura primária, peso molecular, estabilidade térmica e organização molecular, a existência de quatro classes:

- Classe I- os lantibióticos, o seu nome deriva de modificações pós-tradução caracterizada pela presença de lantionina e β -metil lantionina (Riley & Wertz, 2002; Lee & Kim, 2011).

- Formam poros instáveis e têm atividade contra bactérias Gram-positivas intimamente relacionadas e normalmente não tem atividade contra as bactérias Gram-negativas (Lee & Kim, 2011).

- Classes II- são pequenas (<10 kDa) e estáveis ao calor, não possuem lantionina e que podem ser divididos em três subgrupos IIa, IIb, IIc. Classe IIa, são péptidos ativos contra a *Listeria*, com sequência N-terminal definida; Classes IIb, para que estes possuam atividade têm de existir dois péptidos; Classe IIc, são péptidos com tiol ativado, e que requerem resíduos de cisteína reduzidos para que sejam ativos. Sabe-se que as bacteriocinas deste grupo dependem de fosfolípidos aniónicos e receptores para a interação inicial com a membrana (Lee & Kim, 2011; Schulz *et al*, 2003).

- Classe III – estas bacteriocinas são de maior dimensão (> 30 kDa) e são termolábeis.

- Classe IV – bacteriocinas complexas que contêm porções lipídicas ou carboidratos para além da porção proteica, essenciais à atividade. Poucas são as bacteriocinas classificadas pertencentes a estes dois últimos grupos (Lee & Kim, 2011; Schulz *et al*, 2003).

Tabela 1 – Classificação das bacteriocinas LAB

Grupo	Características	Bacteriocinas	
I	Lantibióticos, pequenos péptidos (<5 kDa) com lantionina e â-metil- lantionina.	Nisina	
I	A	Pequenos péptidos, termoestáveis, sintetizados na forma de precursores.	Pediocina pA-1, leucocina A
	B	Sistema de dois componentes, são necessários dois péptidos diferentes para formar um complexo.	Lactococcina G e F, lactacina F
	C	Péptidos que requerem a presença de resíduos cisteína na forma reduzida para que tenha atividade biológica.	Lactococcina B
III	Moléculas grandes sensíveis ao calor	Lactacinas A e B	
IV	Moléculas complexas constituídas por lípidos ou carboidratos.	Leuconocina S	

(Adaptado Cleveland *et al*, 2001)

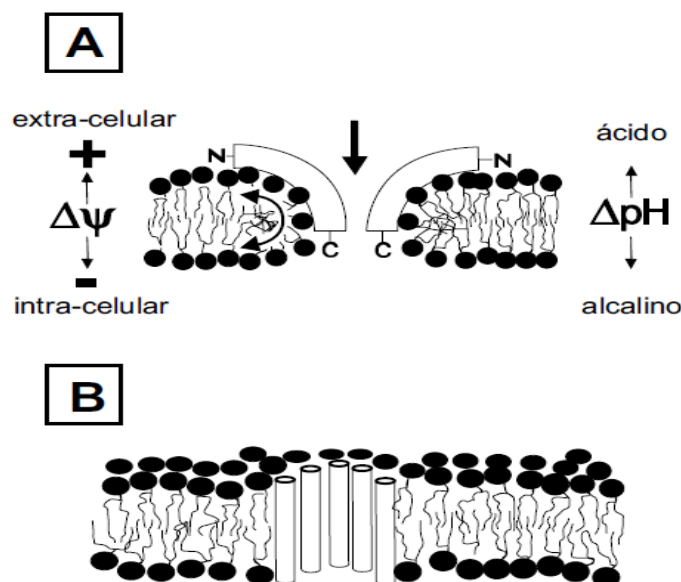
Devido às semelhanças observadas, a classificação acabou por ser adotada também para substâncias produzidas por outras bactérias Gram-positivas. A pesquisa na área de bacteriocinas está a ser muito explorada, devendo ser necessário apenas mais algum tempo até que exista um sistema de classificação definitivo (Schulz *et al*, 2003).

As bactérias produtoras de bacteriocinas possuem um sistema de proteção contra as suas próprias bacteriocinas, designando-se por imunidade. Estas produzem proteínas que se ligam á membrana da bactéria produtora, impedindo a atividade da bacteriocina (Rosa & Franco).

Foram propostos dois modelos de formação de poros para a bacteriocina nisina. Em ambos, propõem que a nisina liga-se á membrana-alvo através de interação electrostática. O primeiro modelo (**figura 1-A**) mostra que a nisina liga-se, através dos resíduos hidrofóbicos presentes, como um monómero nas bicamadas lipídicas e estes monómeros agregam-se lateralmente para a formação dos poros (modelo *Barrel stave*).

No segundo modelo (**figura 1-B**) as moléculas de nisina ligam-se à camada lipídica havendo uma perturbação neste local, formando os poros (modelo *Wedge*) (Shulz *et al*, 2003; Moll *et al*, 1999).

Como já foi referido anteriormente, as bacteriocinas podem ser bacteriocidas ou bacterioestáticas e atuam permeabilizando as membranas das células sensíveis pela formação de poros, causando desequilíbrio iónico. A consequência da formação dos poros está na dissipação da força protónica (PMF), que está envolvida na síntese de ATP, fosforilação e transporte de proteínas, síntese e rotação dos flagelos, entre outras. Cerca de 98,9% de ATP é hidrolisado, para tentar repor a PMF. De seguida, cessa o transporte ativo dos aminoácidos, sendo libertado os de reserva pelos poros, pensa-se que este distúrbio possa gerar a lise celular (Moll *et al*, 1999).



(Fonte: Moll *et al*, 1999)

Fig.1- Modelos propostos para a formação de poros na célula-alvo através da ação da nisina. **A** - *Wedge-like*; **B** - *Barrel-stave* .

1.1.2. Bacteriocinas de Gram-positivas e de Gram-negativas

A classificação das bacteriocinas não tem sido assunto de consenso entre os cientistas. Daí encontrarmos as mais diversas classificações em artigos publicados.

Na família das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas podemos encontrar uma grande diversidade em termos de tamanho, alvos, modos de ação e mecanismos de imunidade (Riley & Wertz, 2002). As mais estudadas são as colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Estas são codificadas por genes plasmídicos e a sua produção é regulada pelo regulão SOS (Riley & Wertz, 2002). As colicinas são produzidas quando existe *stress* no ambiente que as rodeia, estas possuem um domínio de recetores que se ligam a alvos específicos na superfície das células, são estes recetores que permitem o reconhecimento do alvo (Riley & Wertz, 2002).

A piocina produzida pela *Pseudomonas aeruginosa*, é semelhante à colicina mas esta é codificada por genes localizados no cromossoma (Riley & Wertz, 2002). Muitas das bacteriocinas produzidas por Gram-negativas parecem ter sido produzidas por recombinação das bacteriocinas já existentes. Estas possuem essa capacidade, devido a um domínio existente que, no caso das colicinas, produz cerca 50% das proteínas e está envolvido no reconhecimento de recetores específicos na superfície das células (Riley & Wertz, 2002).

As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-Positivas são mais abundantes e mais diversificadas do que as Gram-Negativas (Riley & Wertz, 2002). Estas diferem das Gram-Negativas de dois modos: primeiro a produção de bacteriocinas não implica um evento letal; depois as Gram-positivas têm mecanismos de regulação específica da expressão das bacteriocinas (Riley & Wertz, 2002; Maqueda *et al*, 2008).

O espectro de ação da maioria das bacteriocinas Gram-positivas apenas abrange outras bactérias Gram-positivas. Todavia, existem bacteriocinas particulares que

também têm atividade contra Gram-negativas. Estas são produzidas entre o fim da fase exponencial e início da fase estacionária (Riley & Wertz, 2002).

Algumas Gram-positivas isoladas a partir de solo como o género *Bacillus*, produzem bacteriocinas de interesse, como por exemplo a subtilina isolada a partir de *Bacillus subtilis* (Aunpad & Na-Bangchang,2007). Contudo, só algumas bacteriocinas provenientes de *Bacillus* foram totalmente caracterizadas, despertando o interesse destas como agentes antimicrobianos (Aunpad & Na-Bangchang,2007).

1.2 Bacteriocinas produzidas por *Bacillus*

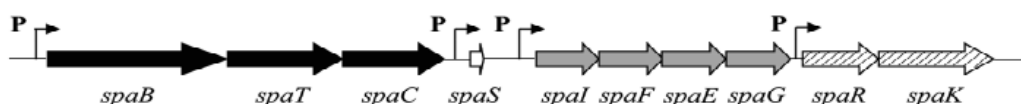
As bactérias pertencentes ao género *Bacillus* são Gram-positivas, aeróbicas e formam endosporos (Abriouel *et al*, 2011). Estas encontram-se em diversos ambientes como o solo, rochas, ambientes aquáticos, vegetação, alimentos e no trato gastrointestinal de vários insetos e animais (Abriouel *et al*, 2011). A capacidade de resistir a todos estes ambientes está nos resistentes endosporos, nas suas propriedades fisiológicas e condições de crescimento (Abriouel *et al*, 2011). A resistência dos esporos ao calor, seca e desinfetantes e também outros meios de esterilização é uma grande preocupação na indústria de processamento de comida (Abriouel *et al*, 2011).

Os estudos sobre o género *Bacillus* são de grande interesse, pois estes produzem uma grande diversidade substâncias antimicrobianas. A produção de bacteriocinas ou *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS) já foi descrita para o *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Geobacillus stearothermophilus*, entre outros. Porém algumas dessas bacteriocinas produzidas são ativas contra um estreito espectro de bactérias, mas existem bacteriocinas com um largo espectro de ação e que têm atividade contra bactérias patogénicas (Bizani & Brandeli, 2002). As bacteriocinas mais investigadas no género *Bacillus* são a subtilina e a subtilosina A (Lee & Kim, 2011).

Para que seja possível a síntese de bacteriocinas é necessário um *cluster* de genes composto por genes estruturais e genes acessórios, que asseguram o transporte, a imunidade, a regulação e todo o processo de maturação das bacteriocinas (Lee & Kim, 2011).

As bacteriocinas são inicialmente sintetizadas como péptidos prematuros com uma sequência *leader* ou sinal no N-terminal. Em todo o processo é necessário algumas proteínas extras para proteger as produtoras contra as suas próprias bacteriocinas. O transporte das bacteriocinas é assegurado pelo sistema de transporte do tipo *ATP-binding cassette* (ABC) (Lee & Kim, 2011).

No caso da subtilina, o *cluster* de genes é composto por 10 genes como ilustra a **figura 2** com um tamanho de aproximadamente de 12 kb, e também possui 4 promotores envolvidos na transcrição (Lee & Kim, 2011).



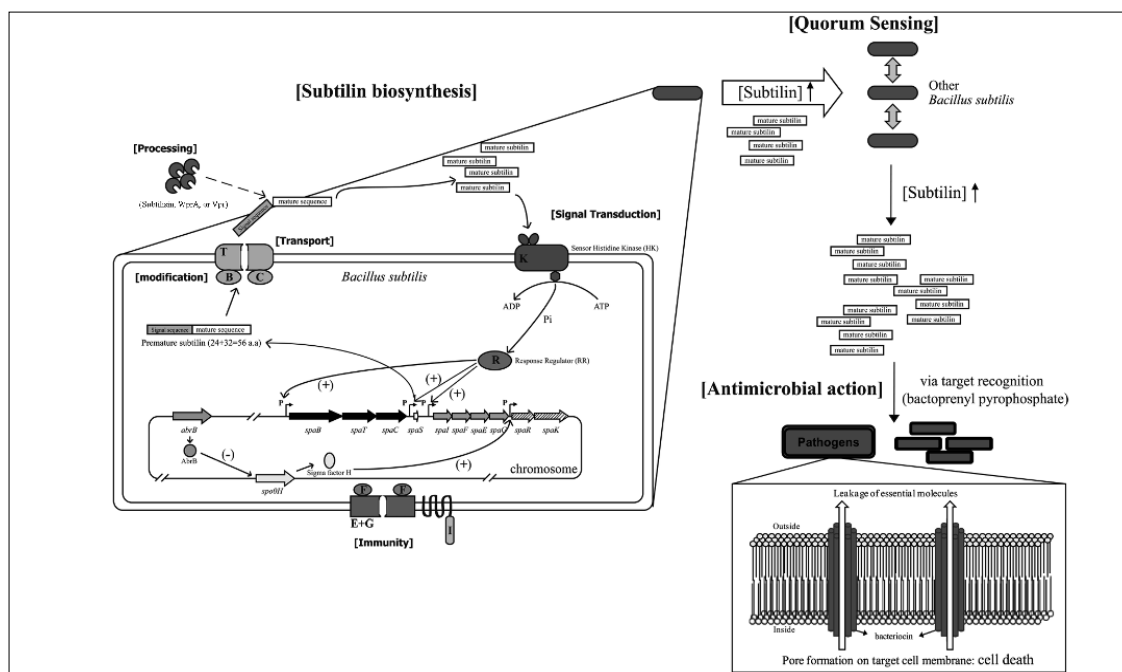
(Fonte: Lee & Kim, 2011)

Fig.2- Organização genética do *cluster* do gene da subtilina. Cada letra maiúscula representa uma proteína envolvida na biossíntese da subtilina. B e C, precursor modificado; T, exportar; S, precursor estrutural da subtilina; I,F,E e G, Imunidade; R e K, sinal de transdução. As setas a negro representam genes necessários para modificações pós- transcrição na maturação da subtilina; as setas a branco são os genes estruturais da subtilina; as setas cinzentas representam os genes envolvidos na imunidade; e as setas sombreadas representam os genes de regulação. A letra P representa os promotores (Lee & Kim, 2011).

O gene estrutural (*spaS*) dá origem a pré-subtilina, composta por 56 aminoácidos, esta vai maturar e dá origem a subtilina ativa contendo 32 aminoácidos. Pensa-se que as proteínas codificadas pelos gene *spaB* e *spaC* estão envolvidos em modificações pós-transcrição (**figura 3**) que ocorrem no citosol da membrana e que o *spaT* dá origem a

uma proteína transportadora do tipo ABC. Esta encontra-se na membrana e exporta a pré-subtilina, e juntamente com os produtos dos genes *spaB* e *spaC* formam um complexo. Este complexo vai modificar a pré-subtilina, depois de exportada a pré-subtilina modificada vai sofrer clivagem proteolítica pelas subtilisina serino protéase (*AprE*), *WprA*, e *Vpr* para formar subtilina madura. No *cluster* de genes encontram-se quatro genes de um operão (**figura 3**) que estão envolvidas codificação de proteínas responsáveis pela na imunidade: o *spaI*, lipopéptido ligado à membrana responsável pela imunidade interagindo com a subtilina; o *spaF*, E e G formam um complexo ligado à membrana, onde duas moléculas de *SpaF* fazem parte do complexo no citosol. Pensa-se que este complexo é um transportador ABC responsável pela saída de subtilina da célula (Lee & Kim, 2011).

A regulação da produção desta bacteriocina é controlada por mecanismos de *Quorum sensing* como ilustra a **figura 3**, que consiste numa comunicação célula a célula utilizando diversos indutores. Estes mecanismos estão associados com a indução de péptidos antimicrobianos, expressão de fatores de virulência, competência genética, esporulação, e outros eventos fisiológicos. A comunicação entre células é assegurada por dois tipos de indutores: análogos de lactona em bactérias Gram-negativas e pequenos péptidos em Gram-positivas. Algumas bacteriocinas podem também induzir a sua própria produção, por fosforilação e desfosforilação do sensor cinase (Lee & Kim, 2011).



(fonte: Lee & Kim, 2011)

Fig.3. Representação esquemática da biossíntese, sinal transdução, da regulação, da subtilina no *Bacillus subtilis*; *Quorum sensing*; Ação antimicrobiana.

A subtilina madura induz a sua própria síntese. Esta é reconhecida pelo sensor cinase (spaK) que consequentemente fosforila um regulador de resposta (spaR). O spaR fosforilado por sua vez vai regular três promotores que se encontram no *cluster* de genes da subtilina. Os sinais de positivo e negativo significam mais ou menos regulação do gene transcrito, respetivamente. Quando a concentração de subtilina aumenta no meio ambiente, outros *B. subtilis* são induzidos a produzir subtilina (*Quorum sensing*). A subtilina liga-se a recetores específicos na superfície da célula e forma poros que por sua vez causam a morte da célula (Lee & Kim, 2011).

Devido ao enorme aumento do número de bacteriocinas descritas para o género *Bacillus*, foi proposta uma nova classificação das grandes bacteriocinas por Abriouel et al, 2010, como podemos verificar na **tabela 2** (Abriouel et al, 2011).

A classe I, da proposta de classificação das bacteriocinas do Género *Bacillus*, inclui péptidos com diferentes tipos de modificações pós- tradução e pode ser dividida em 4 subclasses. Nas subclasses I.1., I.2. e I.3. podemos encontrar péptidos com

modificações semelhantes aos lantibióticos. A subclasse I.4. inclui modificações únicas da subtilosina A (Abriouel *et al*, 2011).

Consequentemente na classe II encontram-se pequenos péptidos, sintetizados no ribossoma, lineares, estáveis ao calor e ao pH e que não possuem modificações. Esta classe também se subdivide, em três subclasses. A subclasse II.1. inclui péptidos *pediocin-like* e a coagulina. A subclasse II.2. por sua vez inclui péptidos *thuricin-like*. Por último, a subclasse II.3. abrange outros péptidos lineares (Abriouel *et al*, 2011).

A última classe desta classificação é a III, que compreende as grandes proteínas (Abriouel *et al*, 2011).

Contudo, nesta classificação ficam algumas bacteriocinas de fora, pois ainda não foram estudadas ao pormenor, mas são chamadas de BLIS (*bacteriocin-like inhibitory substances*) (Abriouel *et al*, 2011).

Tabela 2- Proposta de classificação das bacteriocinas de espécies de *Bacillus* e a sua comparação com as LAB.

Bacteriocinas de espécies de <i>Bacillus</i> Classificação proposta	Exemplos	Bacteriocinas LAB (Nes <i>et al</i> , 2007)
Class I. péptidos modificados Pós-tradução		ClassI. Lantibióticos
Subclasse I.1. péptidos simples lantibióticos elongsados	Subtilina, ericina S e A	
Subclasse I.2. péptidos simples lantibióticos.	Sublancina-168, mersacidina	
Subclass I.3. dois péptidos de lantibióticos	Haloduracina	
Subclasse I.4. outros péptidos modificados pós-transcrição.	Subtilosina A	
Class II. Péptidos não modificados		Class II. Péptidos pequenos e lineares
Subclasse II.1. <i>Pediocin-like peptides</i>	Coagulina	Classe IIa
Subclasse II.2. <i>Thuricin-like peptides</i>	Turicina H, turicina S	
Subclasse II.3. outros péptidos lineares	Cereína 7 ^a	
Class III. Grandes proteínas	Megacina A-216	Classe III. Bacteriocinas grandes e termolábeis

(adaptado Abriouel *et al*,2011)

1.2.1 - *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* produz uma diversidade de BLIS, como por exemplo a cereína 8A. A estirpe que deu origem a esta cereína foi isolada a partir de solo no Brasil por

Bizanni e Brandelli, 2002, e tem as seguintes características: sensível a proteases, estável em pH entre 2-11 e é relativamente termoestável. (Abriouel *et al*, 2011; Oscáriz *et al*, 2005). Este grupo de *Bacillus* tem sido alvo de alguns estudos como se verifica na **tabela 3**.

Tabela 3 – Bacteriocinas e BLIS produzidos por *Bacillus cereus*

Espécies de <i>Bacillus</i>	Fonte	Bacteriocina/BLIS	Peso molecular (kDa)	Características	Classe	Referência
<i>Bacillus cereus</i>	Alimentos	Cereína GN105	9	Activa contra outras estirpes de <i>B.cereus</i>	_____	Naclerio <i>et al</i> , 1993.
	Solo	Cereína 7 ^a	3.94	_____	Subclasse II.3	Oscáriz & Pisbarro, 2000.
	Solo de floresta	Cereína 8A	26	Resíduos de aminoácidos aromáticos	_____	Bizanni & Brandelli, 2002.
	Raízes de plantas aquáticas	Cereína MRX1	3.14	N-terminal	Subclasse II.2	Sebei <i>et al</i> , 2007.

(Adaptado de Abriouel *et al*, 2011)

1.2.2 - *Bacillus mycoides*

O *B.Mycoides* tem sido uma espécie menos investigada, mas também possui alguns BLIS que têm atividade contra alguns agentes patogénicos de alimentos como a *Listeria monocytogenes* e *Leuconostoc mesenteroides*. Este BLIS tem a característica de ser estável a 100°C e a um pH entre 4-11 (Abriouel *et al*, 2011; Sharma & Gautam, 2007).

1.3- Aplicações das bacteriocinas do género *Bacillus*

1.3.1- Aplicações na Saúde humana

O aumento da multi-resistência de diversas bactérias aos antibióticos, resultaram num incremento da procura de bacteriocinas como alternativa a estes antibacterianos.

No género *Bacillus* podem-se encontrar uma variedade de espécies que são consideradas seguras (GRAS- *Generally Recognized as Safe*). Contudo, apenas algumas bacteriocinas do género *Bacillus* são inteiramente conhecidas e caracterizadas pelo seu potencial como agentes antibacterianos. As bacteriocinas podem ser vistas como “drogas desenhadas” que têm como alvo uma específica bactéria, diminuindo a utilização de antibióticos e consequentemente a resistência das bactérias a estes (Riley & Wertz, 2002; Aunpad & Na-bangchang, 2007).

A descoberta destas bacteriocinas foi vista como uma nova medida para controlar bactérias patogénicas resistentes a antibióticos como MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) e VRE (vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*) (Aunpad & Na-bangchang, 2007).

A espécie *Staphylococcus aureus* é a maior causa de infeções na comunidade e nos hospitais, esta desenvolveu resistência á maioria das classes de antibióticos. O último recurso para esta estirpe resistente é a Vancomicina. Todavia, desenvolveu-se uma estirpe também resistente à Vancomicina tornando-se multirresistente. O que é um grave problema de Saúde Pública pois não existe mais classes de antibióticos capazes de destruir estas estirpes multirresistentes. A resistência da espécie *Enterococcus faecalis* á vancomicina é outra preocupação, e ainda não se conhece nenhuma terapia que elimine estirpes multirresistentes, daí o interesse em bacteriocinas com propriedades antibacterianas (Aunpad & Na-bangchang, 2007).

Sabe-se que o *Bacillus pumilus* tem atividade de inibição contra bactérias Gram-positivas incluindo MRSA e VRE, o que leva os investigadores a direcionarem os seus estudos para este campo (Aunpad & Na-bangchang, 2007). O *Bacillus thuringiensis* produz uma bacteriocina contra a *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e

Agrobacterium, o que comprova mais uma vez a importância destes péptidos de síntese ribossomal (Kamoun *et al*, 2011).

Existem também alguns lantibióticos, como a haloduracina e mersacidina que mostram ter boas potencialidades, a haloduracina tem melhor estabilidade ao pH fisiológico do que a nisina e a mersacidina têm atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Já a subtilosina A pode ter uma aplicação contra agentes patogénicos vaginais, como a *Gardnerella vaginalis* resistente às terapias convencionais. Algumas bacteriocinas/BLIS de *Bacillus* também podem ter atividade antifúngica, para além da atividade antibacteriana (Abriouel *et al*, 2011).

As infeções são a maior causa de morbilidade associadas a cirurgias ortopédicas (implantes). Em algumas cirurgias o material para preenchimento dos ossos (CPC-*calcium phosphate-based bone cements*) é revestido com antibióticos para controlar as infeções, contudo o aumento de bactérias resistentes a antibióticos tem vindo a provocar algumas dúvidas na hora de escolher qual o antibiótico a utilizar. A pesquisa de alternativas aos antibióticos tem aumentado e pensa-se que as bacteriocinas podem ser uma boa opção. Alguns estudos foram feitos e a incorporação de bacteriocinas da classe I e II no material de preenchimento de ossos como a brushite revelaram bons resultados, pois são estáveis nestas matrizes e controlam o crescimento de *S.aureus*. O modo de atuação destas bacteriocinas (formação de poros nas membranas) minimiza as hipóteses da estirpe ficar resistente ao péptido (Staden, 2011).

Outra aplicação das bacteriocinas produzidas por *Bacillus* é o uso como probióticos, onde mostram atividade contra agentes patogénicos do intestino, como por exemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* (Abriouel *et al*, 2011).

A utilização de bacteriocinas como um contraceptivo natural, pode ser uma possível aplicação na saúde humana, pois a subtilosina A, mostra ter atividade

espermicida contra os espermatozoides de humanos mas também de outros animais (Abriouel *et al*, 2011).

Têm vindo a ser utilizadas bacteriocinas na composição da matriz de nanofibras. A quantidade de bacteriocina libertada é controlada pela seleção da correta combinação de polímeros. Estes péptidos antimicrobianos pode ser uma possível aplicação na indústria farmacêutica e também na indústria alimentar, no controlo do crescimento de microrganismos (Heunts *et al*, 2011).

Consequentemente existem alguns impedimentos ao uso de bacteriocinas, estas são degradadas por proteases e outras enzimas, daí ser importante protege-las da degradação. Outro problema é o sistema de distribuição das bacteriocinas, que pode ser resolvido com a utilização de sistemas poliméricos de distribuição (Staden, 2011).

1.3.2- Aplicações na Saúde Animal

Algumas espécies de *Bacillus* são utilizadas como probióticos na saúde animal, baseado nas propriedades funcionais, como aumento de peso nos animais de quinta e também na inibição de agentes patogénicos. Por exemplo, a *lichenin* produzida pelo *Bacillus licheniformis* foi descrita por ter atividade antibacteriana contra *Streptococcus bovis* e *Eubacterium ruminantium* (Abriouel *et al*, 2011).

1.3.3- Aplicações ambientais

A utilização de bacteriocinas ou BLIS com atividade antibacteriana e antifúngica como agentes de biocontrolo pode ser uma das aplicações, dado que os *Bacillus* estão naturalmente associados ao solo e às plantas. Algumas dessas bacteriocinas ou BLIS podem inibir as bactérias patogénicas de diversas plantas. Como exemplo temos a Bac 14B produzida pelo *B.subtilis* 14B isolado das raízes de plantas. Esta é ativa contra a

Agrobacterium tumefaciens podendo ser um potencial agente de biocontrolo para reduzir as infeções causadas pela *A.tumefaciens* (Abriouel *et al*, 2011).

Também existem BLIS com atividades antifúngicas que podem ter a finalidade biocontrolar frutas e legumes após a sua colheita (Abriouel *et al*, 2011). Estudos demonstraram que podem existir aplicações mais ambientais, onde BLIS podem controlar a biocorrosão e a formação de biofilmes de bactérias, como as SRB (*sulfate-reducing bacteria*) (Abriouel *et al*, 2011).

1.3.4- Aplicações alimentares

O elevado consumismo levou a uma procura de alimentos sem conservantes químicos, daí a procura de agentes antibacterianos naturais, como as bacteriocinas. Quando se fala em aplicações alimentares, tem de se obedecer a três critérios: têm de ser considerados seguros, têm de possuir qualidade e respeitar regras de nutrição/saúde (Abriouel *et al*, 2011; Millis *et al*, 2011).

As maiorias dos estudos focam mais nas bacteriocinas LAB, como a nisina. A nisina é a única bacteriocina autorizada como bioconservador, e as suas utilizações são limitadas, devido à sua baixa atividade em pH neutro e alcalino. Contudo a aplicação de bacteriocinas sozinhas na alimentação não é suficiente para proteger de contaminações bacterianas, daí ser comum utilizar uma combinação de bacteriocinas e outros agentes conservativos (Abriouel *et al*, 2011; Millis *et al*, 2011).

Tabela 4 – Exemplos de aplicações de bacteriocinas combinadas com outros agentes.

Bacteriocinas	Antibacterianos Naturais	Microrganismo alvo	Aplicação	Referência
Bacteriocina combinada com NaCl				
Enterocina AS-48 (10µg ml ⁻¹)	NaCl (6 ou 7%) 4°C	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meio de cultura	(Ananou et al. 2004)
Bacteriocina combinada com nitrito				
Nisina (450 mg l ⁻¹)	Nitrito (180 mg l ⁻¹)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Caldo	(Gill & Holley 2003)
Bacteriocina combinada com ácidos orgânicos				
Lactacina 3147 (2.500 AU ml ⁻¹)	Citrato de sódio (2%) e lactato de sódio (2%)	<i>Clostridium perfringens</i>	Salsicha fresca de porco	(Scannell et al. 2000b)
Bacteriocina combinada com agentes quelantes				
Nisina (450 mg l ⁻¹)	EDTA (900mg/l)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Caldo	(Gill & Holley 2003)

(Adaptado de Mills *et al*, 2011)

A nisina é ativa contra bactérias Gram-positivas, não afetando Gram-negativas, bolores e leveduras. A parede celular das Gram-negativas, composta por lipopolissacarídeos e proteínas, atua como uma barreira impedindo a nisina de atuar. Contudo se houver a presença de agentes quelantes e pressão hidroestática pode ocorrer a destruturação da parede, deixando a membrana exposta à ação da nisina (Shulz *et al*, 2005).

A subtilisina é utilizada na proteólise de proteínas de soja na produção de molho de soja. Para além disso, melhora a capacidade emulsificante na produção de salsichas e mortadelas e também o sabor em carnes curadas (Shulz *et al*, 2005).

Alguns agentes patogénicos, como a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus spp* causam doenças severas, e conseqüentemente grandes perdas na economia das indústrias de agricultura. Os antibióticos têm sido utilizados para tratar estas enfermidades desde que descobriram a penicilina há cerca de 50 anos atrás. O seu uso contínuo e repetitivo levou ao aparecimento de espécies multirresistentes a antibióticos.

O aparecimento dos péptidos antimicrobianos pode ser uma grande oportunidade para as indústrias de comida, agricultura e saúde (Lee & Kim, 2011).

2. PERTINÊNCIA E OBJECTIVOS DO TRABALHO

O *screening* de bioatividades de 892 isolados de bactérias esporulantes de amostras recolhidas em São Miguel e pertencentes à Coleção Açoriana de *Bacillus* da Universidade dos Açores, colocou em evidência a atividade antibacteriana de muitos destes isolados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Vinte e cinco dos isolados mais ativos mostraram atividade contra MRSA. O objetivo deste trabalho é purificar, identificar e caracterizar as moléculas que estão a ser produzidas por estes isolados açorianos e qual a sua potencial aplicação no controlo de bactérias.

O número cada vez maior de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos atualmente utilizados coloca grandes desafios no tratamento de infeções, tanto no homem como nos animais. O esforço de investigação realizado na pesquisa de novas substâncias com atividade antibacteriana, que sejam ativas contra estas estirpes resistentes, será cada vez maior. Este trabalho é de grande relevância, uma vez que pretende identificar bacteriocinas que possam ter aplicação contra estas estirpes bacterianas resistentes a antibióticos. Estas substâncias têm aplicações mais vastas, que incluem a preservação alimentar e o controlo de doenças em plantas.

Os objetivos deste trabalho são:

- Otimização das condições de cultura de 2 isolados de *Bacillus* selecionados para a obtenção de maior atividade antibacteriana.
- Identificação da natureza proteica da atividade antibacteriana recolhida no sobrenadante.
- Seleção do isolado com maior atividade contra bactérias resistentes (MRSA).
- Purificação e caracterização das bacteriocinas produzidas pelo isolado selecionado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

Para o crescimento dos isolados utilizaram-se os seguintes meios de culturas: Caldo Nutritivo (CN) (*Merck*), *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Difco*), Peptona Tamponada (PT) composta pelos seguintes constituintes: 10 g de peptona bacteriológica da *Diagnostic Liofilchem*, 5 g de Cloreto de sódio (NaCl) da *Ridel-de Haen*, 3,5 g de di-sódiohidrogénio fosfato (*Merck*) e 1,5 g di-hidrogénio potássio (*Merck*). *Soft Nutrient Agar* (SNA) foi o meio sólido escolhido para realizar o teste de difusão em agar (*Agar Well diffusion-AWD*), composto por Agar Nutritivo (*Merck*) e 7g de agar bacteriológico (*Merck*).

3.2 -Culturas bacterianas

As estirpes das bactérias indicadoras listadas na **tabela 5** pertencem à coleção do laboratório do Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN) da Universidade dos Açores e estão mantidas em Agar Nutritivo a 4°C. A estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) foi identificada com o nome de isolado hospitalar 1 (IH1), pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia do Hospital Divino Espírito Santo e está mantida em Agar Nutritivo a 4°C. Estes organismos foram recuperados em meios e temperaturas adequadas como está indicado na **tabela 5**.

Tabela 5-Recuperação das estirpes de referência.

*Organismo indicador	Meio	Temperatura (°C)
<i>Bacillus cereus</i> DSM-31	Caldo nutritivo	30°C
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM-13 <i>Micrococcus luteus</i> DSM-20030	Caldo nutritivo	30°C
<i>Micrococcus luteus</i> DSM-20030	Caldo nutritivo	30°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923D-5	Caldo nutritivo	37°C
IH1-MRSA	Caldo nutritivo	37°C
<i>Enterobacter cloacae</i> DSM-30850	Caldo nutritivo	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Caldo nutritivo	30°C
<i>Escherichia coli</i> DSM-498	Caldo nutritivo	37°C

*DSM- Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture;

*ATCC -American Type Culture Collection;

3.3 -Recuperação dos isolados

Os isolados S54c e S150c utilizados pertencem à Coleção Açoriana de *Bacillus* e foram recuperados a partir dos esporos que se encontravam á temperatura ambiente em tiras de papel de filtro desidratados. Colocou-se uma tira em 5mL de caldo nutritivo, a 30°C e numa agitação de 190 rpm, a partir desta cultura isolaram-se colónias em placas de agar nutritivo que foram mantidas a 4°C e repicadas mensalmente.

Estes isolados foram selecionados com base na informação contida na da base de dados da coleção de *Bacillus*, presentes na **tabela 6**.

Tabela 6 – Características da base de dados de *Bacillus* referente aos isolados S54c e S150c.

Isolados	Grupo	Características
S54c	<i>B.cereus</i>	Atividade contra: <i>B.licheniformis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>E.coli</i> , <i>M.luteus</i> , <i>S.aureus</i> e <i>MRSA</i> . Produção de proteases extracelulares.
S150c	<i>B.Mycooides</i>	Atividade contra: <i>B.licheniformis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>E.coli</i> , <i>M.luteus</i> , <i>S.aureus</i> e <i>MRSA</i> . Produção de proteases extracelulares.

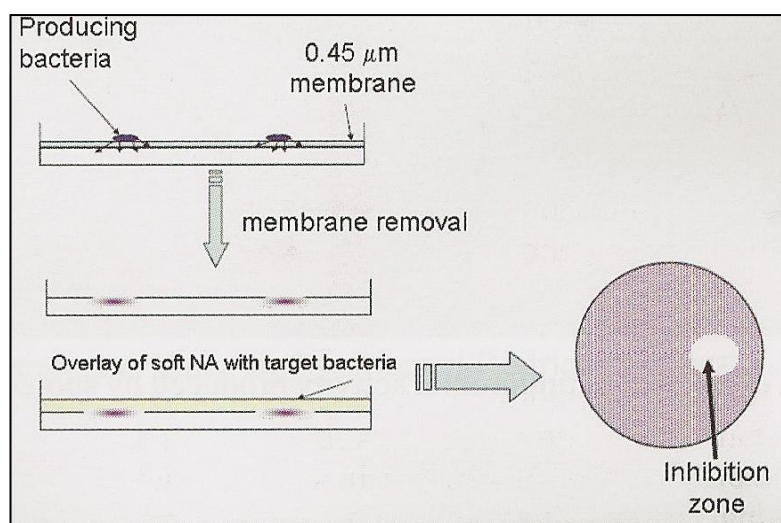
3.4 – Estudo das condições de crescimento

Seguiu-se o crescimento dos isolados S54c e S150c em três meios de cultura, BHI, CN e PT. Prepararam-se pré-inóculos dos dois isolados em 5 mL de cada um dos meios de cultura. Estes pré-inóculos foram incubados a 30°C por 18 horas a 190 rpm. Depois colocou-se 1 mL de cada pré-cultura num erlenmyer com 50 mL de meio (BHI, CN e PT) e foi mantida uma incubação a 30°C com uma agitação de 190 rpm, por 0, 6, 18, 24 e 30 horas. Em cada um destes momentos recolheu-se 1 mL de cada cultura para medir a densidade ótica (D.O.) aos 600 nm no nano espectrofotómetro (*Implen*) e para testar a atividade antibacteriana do sobrenadante. Fizeram-se três repetições deste ensaio.

3.5 – Atividade antibacteriana dos isolados S54c e S150c

Para estudar o espectro de atividade antibacteriana dos isolados S54c e S150c utilizou-se o método descrito em Moujir *et al*, 2012, para bactérias esporulantes. Colocou-se uma caixa de Petri com agar nutritivo a incubar a 37°C por uma hora, para

retirar toda a humidade. De seguida, aplicou-se uma membrana de acetato de celulose de 0.45µm e 85 mm de diâmetro sobre o agar nutritivo esterilizado. Inoculou-se 2/3 colónias da cultura da bactéria S54c, num pequeno círculo sobre a membrana (evitar as extremidades da membrana) e foi a incubar 30°C, *overnight*. Após incubação, a membrana foi cuidadosamente retirada. A um tubo com 5 mL de SNA e adicionou-se 100µL bactéria indicadora ($10^{4/5}$ CFU/mL). Homogeneizou-se e colocou-se por cima da caixa de Petri. Por fim, colocaram-se as caixas de Petri a incubar a 37°C, *overnight*. O espectro de atividade foi estudado para as seguintes bactérias indicadoras: *E.coli* DSM-498, *P.aeruginosa* ATCC-27853, *M.luteus* DSM- 20030, *S.aureus* ATCC-259230-5, MRSA (IH1). Na **figura 3** está ilustrada a referida técnica.



(fonte: Moujir *et al*, 2012)

Fig. 3-Teste de atividade antibacteriana em bactérias esporulantes.

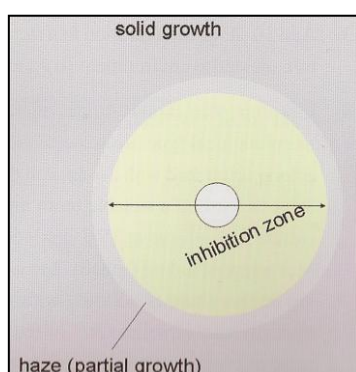
3.6 -Preparação dos sobrenadantes das culturas bacterianas

As culturas foram centrifugadas a 15 000 ×g por 20 minutos a 11°C (centrifugadora *Sigma*) e por fim, os sobrenadantes foram recolhidos, filtrados em

membranas de 0,20 μm de acetato de celulose (*Sartorius stedim, minisart RC15*) e foi medido o pH de ambos os sobrenadantes. Os filtrados foram guardados em frascos esterilizados a -20°C , até serem utilizados.

3.7 -Teste da atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana, dos sobrenadantes filtrados e das frações obtidas durante o processo de purificação, foi detetada em teste de difusão em agar (*Agar Well Difusion-AWD*). Esta técnica encontra-se descrita em Tagg & McGiven, 1971. Adicionou-se 100 μl de uma diluição em soro fisiológico 1:100 da cultura de *M.luteus* com 48 horas de incubação a 30°C e 190 rpm, a 25 mL de meio SNA e homogeneizou-se. Espalhou-se numa caixa de Petri e, dependendo do número de amostras a testar, fizeram-se poços com um diâmetro aproximado de 7mm, utilizando a parte posterior de uma Pipeta de Pasteur esterilizada. A base de cada poço foi selada com 15 μl de SNA. Uma alíquota de 100 μl de sobrenadante filtrado foi aplicada em cada poço. De seguida as placas foram incubadas a 4°C por 2 horas, para permitir a difusão da amostra. Por fim, as placas foram incubadas às temperaturas e tempos adequados a cada. A atividade foi avaliada através da medição dos halos de inibição em milímetros (mm).



(fonte: Moujir *et al*, 2012)

Fig.4- Esquematização de um halo de inibição por teste de difusão em agar.

3.8 – Concentração e fracionamento

Recolheu-se o sobrenadante de cada uma das culturas de 50 mL (isolados S54c e S150c) em meio BHI com 18 horas de incubação. Estes foram concentrados e fracionados através da utilização de tubos de centrifugação *Centricon* (*Millipore*) com membranas de *cut-off* 30 kDa e 3kDa. A fração com *cut-off* superior a 30 kDa foi obtida após 20 minutos centrifugação a 5,000 ×g, 4°C. Esta fração foi diluída em Tris-HCl a 20 mM, pH 8,0 e novamente concentrada nas mesmas condições para eliminar parte do meio de cultura e posteriormente guardada a -20°C. A fração com *cut-off* inferior a 30 kDa foi colocada num novo tubo *Centricon* com uma membrana de *cut-off* 3 kDa e centrifugada durante 40 minutos, a 5,000 ×g, 4°C. Esta fração, com pesos moleculares entre 3 e 30kDa, foi também dialisada em tampão Tris-HCl a 20 mM, pH 8,0 e guardada a -20°C. As frações maiores que 30kDa e as frações entre 3 e 30kDa dos sobrenadantes dos isolados S54 e S150c, foram testadas em difusão em agar contra *M.luteus*. O sobrenadante filtrado do S54c e as frações >30kD e entre 3-30kDa do sobrenadante do isolado S54c também foram testadas para as seguintes bactérias indicadoras, utilizando o teste de difusão em agar anteriormente descrito: *B. cereus* DSM-31, *B.licheniformis* DSM-13, *S.aureus* ATCC-259230-5, *E.coli* DSM-498, *E.cloacae* DSM-30850 e MRSA (IH1).

3.9 -Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas

Alíquotas de 500 µl de sobrenadante livre de células foram expostas às temperaturas de 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° e 100°C por 30 minutos e a 121°C por 15 minutos. Utilizou-se como controlo positivo o sobrenadante livre de células sem qualquer tipo de aquecimento. As amostras e o controlo foram testados pelo teste de difusão em agar com a bactéria indicadora *M.luteus*.

Três enzimas foram testadas sobre o sobrenadante livre de células, quimiotripsina, proteínase K e α -amílase (*Sigma-Aldrich*). Preparou-se 1mL de solução com concentração final de 40 mg/mL para a quimiotripsina e proteínase K e 100 mg/mL para α -amílase em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7.4, que foram esterilizadas por filtração em membrana 0,20 μ m (*Sartorius Stedin, minisart RC15*). Às alíquotas de sobrenadante de cada isolado (S54c e S150c) foram adicionadas as diferentes enzimas, numa concentração final de 1mg/mL. Prepararam-se controlos para o teste enzimático, Controlo 1: sobrenadante livre de células, Controlo 2: sobrenadante + tampão fosfato de sódio 50mM pH 7.4, Controlo 3: tampão fosfato sódio 50mM pH 7.4 + enzima. As alíquotas e controlos foram incubados durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as enzimas foram inativadas a 90°C durante 5 minutos num termobloco (*eppendorf-Thermostat Plus*). Os controlos 2 e 3 sofreram as mesmas condições anteriormente descritas. Finalmente, as amostras e controlos foram todas testadas para determinar a sua atividade antibacteriana em teste de difusão em agar com a bactéria indicadora *M.luteus*.

O teste de sensibilidade a enzimas hidrolíticas e de estabilidade térmica foram realizados também para as frações entre 3-30 kDa e >30 kDa do isolado S54c, nas mesmas condições acima descritas, exceto na concentração das enzimas. As reações foram preparadas para uma concentração final de enzima de 20 mg/mL.

3.10- Purificação parcial S54c

O 50 ml de sobrenadante da cultura em BHI (livre de células) do isolado S54c, com 18 horas de incubação, foi concentrado por liofilização e posteriormente ressuspendido em tampão 20mM Tris-HCl a pH 8,0, perfazendo um volume final de

8mL. Frações de 2ml desta amostra foram aplicadas numa coluna preparativa de exclusão molecular, *Sephacryl S-200* 40 ml (GE), previamente equilibrada com tampão 20 mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de NaCl. A proteína foi eluída com o tampão de equilíbrio a um *flow rate* de 1,5 ml por minuto e recolhida em alíquotas de 4 ml. As frações foram recolhidas e concentradas em *Centricon cut-off* 3kDa, filtradas a 0,2 µm e testadas em difusão em agar com a bactéria indicadora *M.luteus*.

A fração da cromatografia de exclusão molecular que apresentou atividade antimicrobiana foi dialisada em 50mM Tris-HCl a pH 8,8, utilizando *Centricons* de *cut-off* 3kDa, e aplicada em cromatografia de troca iónica para tentar purificar a proteína ativa. A fração ativa foi aplicada numa coluna *HitrapQ HP* (GE) previamente equilibrada com 50mM Tris-HCl a pH 8,8 e a proteína eluída a um *flow rate* de 0,7 ml por minuto num gradiente linear de 50mM Tris-HCl com 1M NaCl a pH 8,8. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4°C. A proteína eluída foi recolhida em frações de 1ml. Estas frações foram identificadas, filtradas a 0,2 µm e mais tarde testadas em difusão em agar contra a bactéria indicadora *M.luteus*.

A quantidade de proteína total da amostra inicial do sobrenadante do meio de cultura (livre de células) e o sobrenadante do meio de cultura liofilizado foram quantificadas pelo método da BSA (*Pierce*), seguindo as instruções acompanhadas pelo *Kit*. As absorvâncias foram obtidas num leitor de microplacas (*Bio-Rad, Model 680*) e a quantidade de proteína calculada com base numa reta de calibração realizada com albumina. A proteína presente nas frações cromatográficas foi quantificada com Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

3.11 - SDS-PAGE

A fração da cromatografia de exclusão molecular que apresentou atividade antimicrobiana foi separada em eletroforese de 14% de poliacrilamida (SDS-PAGE). A corrida eletroforética foi feita realizada num sistema vertical *MiniProtein II* (Bio- Rad) com amperagem fixa de 25 mA e voltagem máxima de 140 V. A eletroforese foi seguida tendo por referência a frente de corrida do tampão de amostra. Foram utilizados marcadores de peso molecular da *nzycolour protein marker II* (Nzytech).

3.12- Amplificação e Sequenciação de um fragmento do gene 16S do isolado S54c

3.12.1-Extração do DNA

O DNA do S54c foi isolado a partir de uma cultura em fase exponencial, incubada a 30°C em 5 mL de caldo nutritivo durante 16 horas com uma agitação de 190 rpm. Centrifugou-se 1 mL da cultura a 13 000 rpm durante 10 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µl de água destilada. Seguidamente as células sofreram lise por choque térmico, as células foram colocadas a -80°C por 15 minutos e em seguida foram aquecidas a 95°C por 15 minutos. Finalmente foram centrifugadas e colocadas a -20°C para posterior utilização.

3.12.2-Condições de Amplificação do fragmento 16S

Um fragmento do gene 16S foi amplificado utilizando os primers específicos para o género *Bacillus*, B-K1/F (5'-TCACCAAGGCACGATGCG-3') e B-K1/R (5'-CGTATTCACCGCGGCATG- 3'), tal como descrito por Wu *et al*, 2006. A amplificação decorreu num termociclador da *Applied Biosystem* (*Veriti 96Well Thermal cycler*) com um volume de reação de 25µl. Foram adicionados 5 µl de DNA à mistura contendo 0,2 Mm de dNTP's (*Sigma-Aldrich*), 1x solução tampão (*Sigma-Aldrich*), 1.0

μM de cada primer (B-K1/F e B-K1/R) e 1 unidade de DNA Taq polimerase (*DreamTaq*). O programa de PCR utilizado é composto por um passo inicial de desnaturação por 3 minutos a 94°C , seguindo-se por 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, por fim um passo de extensão a 72°C por 10 minutos. Ainda neste PCR incluíram-se dois controlos: H_2O -MQ (controlo negativo) e DNA de *B.cereus* DSM-31 (controlo positivo).

3.12.3 – Electroforese em Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram separados numa electroforese em gel de agarose (*Sigma-Aldrich*) a 1,5% em 0,5x de TBE (45mM Tris, 45Mm ácido bórico, 1 mM de EDTA, pH 8,0) contendo $1\mu\text{g/ml}$ de Brometo de Etídio. A uma alíquota de $4\mu\text{l}$ de produto de PCR adicionou-se $1\mu\text{l}$ de tampão de corrida, azul de bromofenol. A migração ocorreu durante 40 minutos a 100 V. Por fim removeu-se cuidadosamente o gel e visualizaram-se as bandas no aparelho de luz UV (Gel Doc, *Bio-Rad*) e fotografou-se o gel. O tamanho dos fragmentos de DNA foram estimados utilizando os marcadores de 100bp e 1kb (*Sigma-Aldrich*) (Wu *et al*, 2006).

3.12.4 – Purificação do produto de PCR

Para purificar o produto do PCR utilizou-se um kit de purificação (*invitrogen-PureLinkTM PCR purification kit*) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de purificado, o DNA foi quantificado num espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (*Thermo Scientific*) e guardado a -20°C para posterior sequenciação.

3.12.5- Sequenciação do DNA e análise

As amostras contendo o fragmento do gene 16s do isolado S54c, foram enviadas para o laboratório *STABVida* para sequenciação. Foram realizadas duas reações de sequenciação utilizando os primers B-K1/F e B-K1/R. A sequência consenso foi obtida pelo alinhamento das duas sequências obtidas, utilizando o programa *ClustalW* implementado no programa *Bioedit*.

O estudo de homologia, para a sequência consenso para o fragmento do gene 16S, foi realizado no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com recurso ao programa *BLAST*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De entre 892 de isolados de espécies *Bacillus* isolados a partir do solo nos Açores, mais precisamente na ilha de S. Miguel, 2 foram selecionados pela sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias resistentes a antibióticos, neste caso MRSA. Esta informação está contida na base de dados da coleção de *Bacillus* e resultou de um *screening* alargado da coleção, utilizando um método de co-inoculação. Os isolados selecionados foram o isolado S45c e o isolado S150c.

4.1 -Estudo das condições de crescimento

Os ensaios permitiram estudar as condições de crescimento dos isolados S54c e S150c, no que diz respeito aos meios de cultura utilizados e também ao tempo de incubação das culturas, de modo a maximizar a produção das substâncias com actividade antibacteriana em meio líquido (**figura 5**). O meio BHI revelou maiores valores de D.O., o que indica um maior crescimento bacteriano, para ambos os isolados. Por sua vez, o meio PT apresentou valores mais reduzidos, tendo sido o meio em que o crescimento bacteriano foi menor. Este fato pode ser explicado pela diferente composição dos meios, o meio BHI é um meio mais rico em nutrientes enquanto o meio PT é mais pobre em nutrientes.

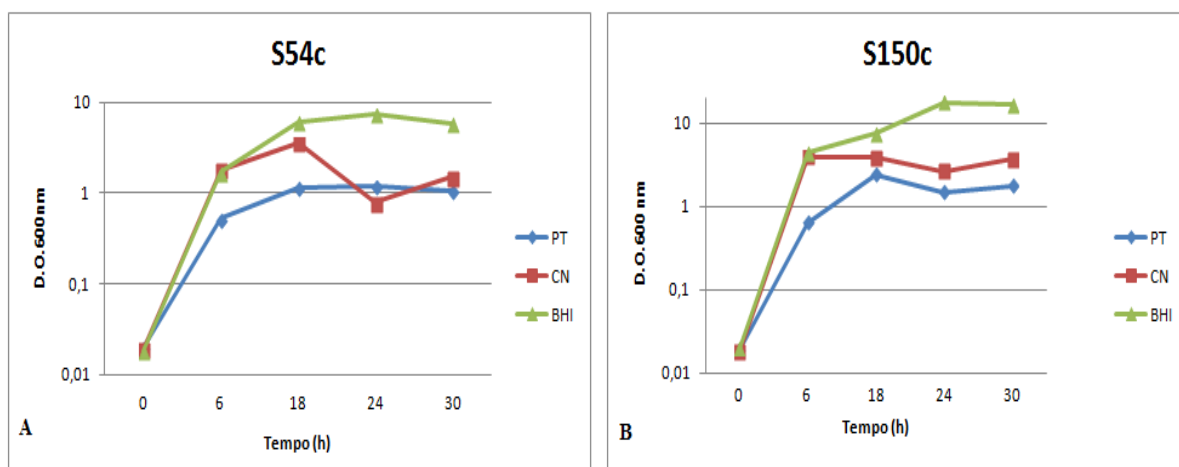


Fig.5- Curvas de crescimento: **A-** Isolado S54c em meio BHI, CN e PT a 30°C;**B-** Isolado S150c em meio BHI, CN e PT a 30°C.

A atividade antibacteriana contra a bactéria *M.luteus*, aferida a cada momento das curvas de crescimento, mostrou que só às 18 horas de incubação é possível detectar atividade, em todos os meios de cultura testados (**tabela 7**). Porém, a cultura em meio BHI foi aquele onde se evidenciou um maior halo de inibição. Com base nestes resultados as condições escolhidas para a cultura dos isolados S54c e S150c foram o meio BHI com 18 horas de incubação, 190rpm a 30°C.

Tabela 7 – Atividade antibacteriana do sobrenadante dos isolados S54c e S150c, para os diferentes meios de cultura e tempos de incubação.

Horas incubação	Meios de cultura/atividade					
	S54c			S150c		
	BHI	CN	PT	BHI	CN	PT
0	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
18	+++	++	+	+++	++	+
24	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-

* + (halo de inibição entre os 10mm e os 40mm), ++ (halo de inibição entre os 50mm e os 90mm), +++(halo de inibição entre os 100mm e os 140mm).

Estes resultados indicam que as moléculas com atividade antibacteriana são produzidas no início da fase estacionária onde se atinge o maior crescimento e produção de metabolitos. Resultados semelhantes foram descritos por alguns autores, tais como, Guo *et al*, 2012; Bizani & Brandeli, 2004 e Bizani & Brandeli 2002. Alguns estudos mostram que existe correlatividade entre a produção de biomassa e bacteriocinas, o que indica que são metabolitos primários (Parente *et al*, 1994). Estudos mostram que o mecanismo de *quórum sensing* pode interferir na produção de bacteriocina, assim, quando aumenta a concentração de bacteriocina no meio, pode induzir as outras bactérias a produzir bacteriocinas. Outros mostram que pode não existir essa correlatividade (Biswas *et al*, 1991). O desaparecimento da atividade do sobrenadante em períodos de incubação mais longos pode, também, estar relacionado com a produção de proteases pela bactéria. Pois, de acordo com a informação recolhida na base de dados da coleção de *Bacillus* os isolados S54c e S150c produzem proteases extracelulares.

Assim, pode-se afirmar que a produção de eventuais bacteriocinas é influenciada pela composição do meio de cultura e também pelas condições de crescimento, sendo mais elevada em meios de cultura ricos e surge no meio de cultura durante o início da fase estacionária. Contudo, o uso de meios de cultura mais complexos como o BHI pode dificultar mais tarde a purificação das moléculas ativas.

4.2-Atividade antibacteriana dos isolados S54c e S150c

O espectro de atividade antibacteriana dos isolados S54c e S150, foi estudado pelo método de avaliação da atividade antibacteriana para bactérias esporuladas (Moujir et al, 2012). Verificou-se a existência de inibição de crescimento contra as seguintes bactérias indicadoras *M.luteus*, *S.aureus* e MRSA (IH1). No entanto, para as bactérias Gram-negativas testadas (*P. aeruginosa* e *E.coli*) não mostrou existir qualquer tipo de atividade antimicrobiana. Para o isolado S54C o maior halo de inibição foi obtido contra *M.luteus* (370 mm). Para o *S.aureus* obteve-se um halo de inibição de 200mm e para os MRSA (IH1) um halo de inibição de 250 mm (**figura 6**). Para o isolado S150c obteve-se atividade menor que a observada para S54C contra as bactérias indicadoras *M.luteus*, *S.aureus* e MRSA, não sendo medidos os diâmetros dos halos.

A atividade de bacteriocinas sobre MRSA e *S.aureus* já foi descrita por alguns autores para outras bacteriocinas produzidas por *Bacillus*. Entre estes, Aunpad & Na-Bangchang, 2007, relatam a inibição de *S. aureus* e de uma estirpe de MRSA pela bacteriocina pumicilina 4.

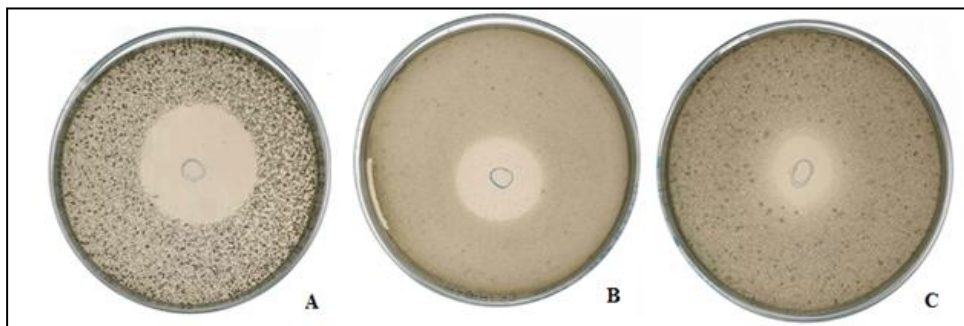


Fig. 6 – Atividade antibacteriana do isolado S54c. **A-** *M.luteus* (370 mm); **B-** MRSA (IH1) (250mm); **C-** *S.aureus* (200mm)

4.3- Concentração e fracionamento

Depois de se ter analisado a ação do sobrenadante filtrado de cada isolado sobre a bactéria indicadora, fez-se um fracionamento utilizando membranas de diferentes *cut-off*, mais precisamente 30kDa e 3kDa. As frações obtidas foram testadas pelo método de difusão em agar contra *M. luteus*. O isolado S150c produz moléculas ativas com um tamanho molecular entre os 3 e os 30 kDa (120 mm) e moléculas ativas com um tamanho molecular maior que 30kDa (110 mm) (**figura 7-A**). O isolado S54c produz moléculas ativas com um peso molecular maior que 30kDa (110 mm) e moléculas ativas com um peso molecular entre os 3 e os 30 kDa (130 mm) (**figura 7-B**). Para o isolado S54c foi ainda observada uma atividade inibitória na fração com peso molecular menor que 3kDa.

Através da análise destes resultados podemos dizer que estamos perante duas moléculas diferentes, uma >30kDa e outra entre os 3-30 kDa, podendo estas ser ou não bacteriocinas ou BLIS.

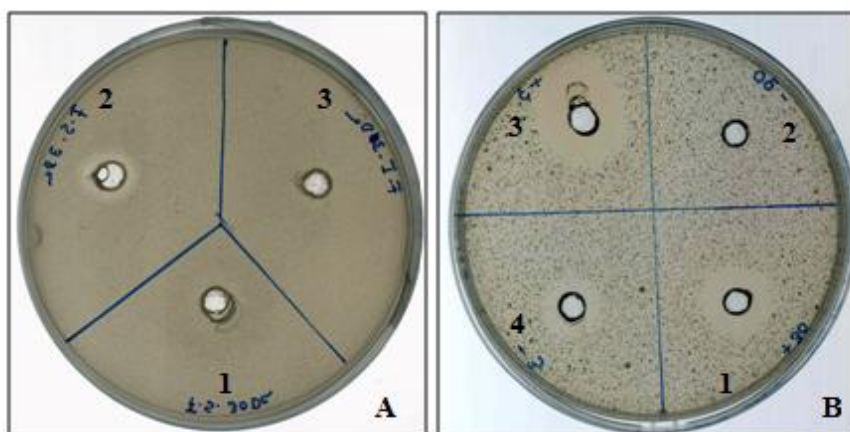


Fig.7- Atividade antibacteriana dos isolados **S150c-A** (1- >30kDa (110mm); 2- 3-30kDa (120 mm); 3- <30 kDa) e **S54c-B** (1->30kDa (110mm); 2-<30kDa; 3- 3-30kDa (130 mm); 4-<30kDa).

4.4- Espectro de atividade do isolado S54c

O sobrenadante livre de células do isolado S54c e as moléculas obtidas após fracionamento com membranas de diferentes *cut-off* (com tamanho molecular entre os 3 e 30 kDa e maior que 30kDa) foram testadas contra várias bactérias indicadoras (**tabela 8**). Verificou-se que existe uma atividade contra *M.luteus* e *B.cereus* (**Anexo I**).

Estes resultados são interessantes pois pensa-se que o isolado S54c seja um *B.cereus*, logo temos uma atividade contra bactérias da mesma espécie, característica já descrita por algumas bacteriocinas que têm atividade contra bactérias filogeneticamente muito próximas (Lee & Kim, 2011).

Por outro lado, esperava-se observar atividade contra *S.aureus* e a estirpe resistente IH1, pois os dados iniciais indicavam uma sensibilidade positiva, contudo isso não se revelou para o teste de difusão em agar. Estes dados podem indicar, por um lado, que a produção da substância que inibe o crescimento destas bactérias, nas condições de cultura em meio líquido, possa estar abaixo da concentração mínima inibitória (MIC), daí este teste ser menos sensível para estas bactérias indicadoras. Por outro lado, a

bactéria pode mesmo não produzir a molécula ativa contra *S.aureus* em meio de cultura líquido

O pH dos sobrenadantes dos isolados S54c e S150c foi avaliado para determinar a acidez ou basicidade. Verificou-se que o sobrenadante do isolado S54c tinha um pH de 8.5 e o sobrenadante do isolado S150c um pH de 8.0. Esta informação é importante para averiguar se a acidez ou basicidade interfere como crescimento da bactéria indicadora. Estes valores de pH não serão os responsáveis pela inibição de crescimento das bactérias indicadoras, tal como ocorre com as LAB (Vuyst & Leroy, 2007).

Tabela 8 - Espectro de atividade das frações do sobrenadante do isolado S54c.

Sensibilidade* Organismo indicador	S54c	S54c >30 kDa	S54c 3-30 kDa
	<i>Bacillus cereus</i> DSM31	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> DSM200	+	+	+
<i>Stapylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-
IH1-MRSA	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> DSM-30850	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DSM498	-	-	-

*(+ Presença de halo de inibição;- ausência de halo de inibição)

4.5- Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas

Para avaliar a estabilidade térmica das moléculas ativas, o sobrenadante filtrado das culturas de S54c e de S150c foi submetido a incubações a diferentes temperaturas e depois testado pelo método de difusão em agar contra *M. luteus*. Observou-se que as moléculas ativas apresentam grande estabilidade a temperaturas elevadas (**figura 8**). A partir dos 80°C a atividade reduz e aos 121°C é completamente inibida. Também se verifica que o isolado S54c forma halos de inibição superiores aos do isolado S150c.

Este estudo demonstra assim, possíveis aplicações destas bacteriocinas por exemplo na alimentação, pois não perdem a sua actividade com temperaturas até 100°C (Kindoli *et al*, 2012; Guo *et al*, 2012 e Ryan *et al*, 1996). Segundo os autores Guo *et al*, 2012; Kindoli *et al*, 2012, existe um declínio de actividade com o aumento da temperatura, o que se verifica de alguma forma, nos presentes resultados. Em Bizani & Brandeli, 2002 e Cladera-Olivera *et al*, 2004, é referido que a atividade desaparece aos 121°C, resultado análogo ao deste estudo. Estas observações podem indicar a presença de BLIS nos sobrenadantes de S54c e de S150c.

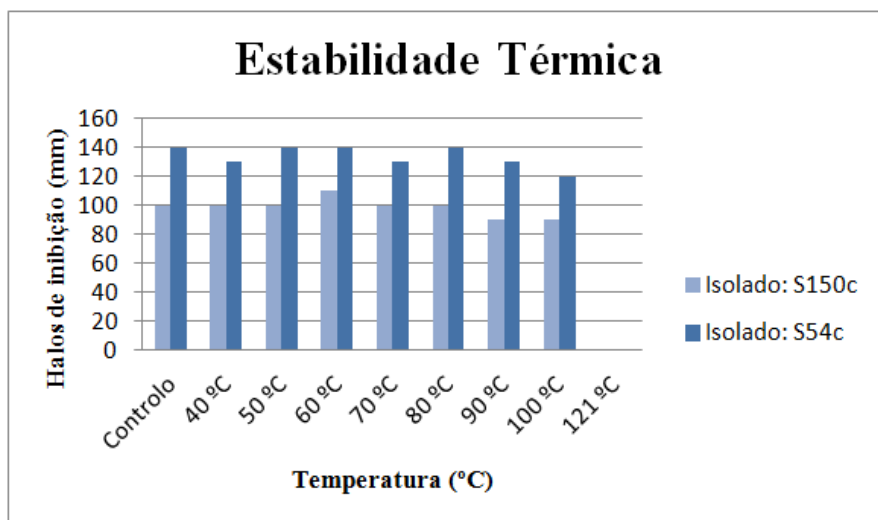


Fig.8 – Estabilidade térmica da atividade antibacteriana dos sobrenadantes filtrados dos isolados S150c e S54c. Controlo: sobrenadante livre de células filtrado sem qualquer aquecimento.

Estabilidade térmica também foi demonstrada para as duas frações do sobrenadante do isolado S54c (>30kDa e 3-30kDa), (**figura 9**). Verificou-se a existência de uma diferença na estabilidade térmica entre as duas frações. Na fração > 30kDa existe um decréscimo da estabilidade térmica, contudo mantém-se a atividade até aos 100°C. Enquanto a fração entre os 3-30kDa mantém a sua atividade e estabilidade térmica até aos 121°C (**Anexo II**).

Esta estabilidade térmica elevada, não é muito comum encontrar-se no mundo das bacteriocinas. Normalmente estas são estáveis até 100°C no máximo, como a fração >30kDa do sobrenadante do isolado S54c e como descrito em Kindoli *et al*, 2012; Guo *et al*, 2012. Contudo o autor Singh *et al*, 2012, refere a existência de uma bacteriocina com 5,6kDa resistente á temperatura de 120°C, semelhante ao resultado obtido. Também Aunpad & Na-Bangchang, 2007, já tinham descrito uma bacteriocina, pumicilina 4, resistente á temperatura de 121°C. Estes resultados mostram a variedade e a complexidade das bacteriocinas.

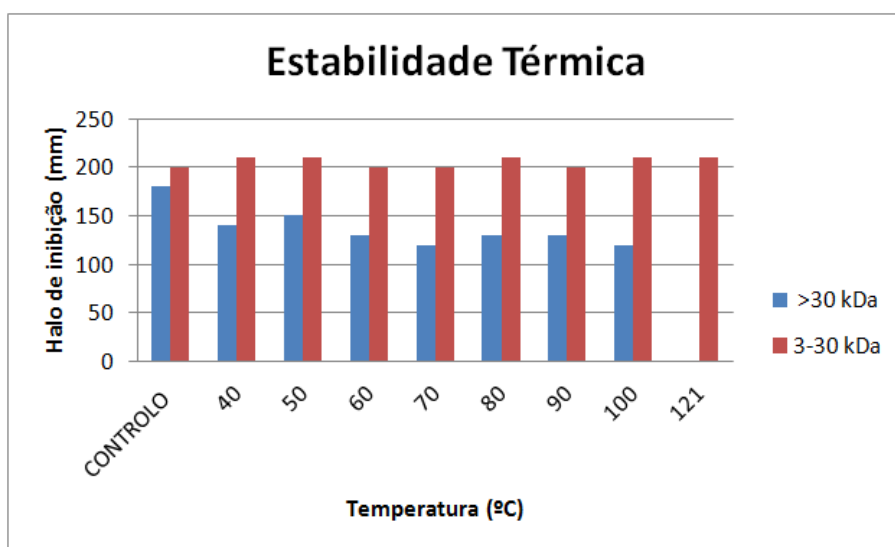


Fig.9 – Estabilidade térmica da atividade antibacteriana das frações >30kDa e 3-30kDa do sobrenadante do isolado S54c. Controlo: sobrenadante livre de células filtrado sem qualquer aquecimento

Foi realizado um estudo, para averiguar sensibilidade a enzimas hidrolíticas do sobrenadante livre de células dos isolados S54c e S150c e sobre as frações >30kDa e entre 3-30kDa do sobrenadante do isolado S54c (**tabela 10**). Verifica-se que os sobrenadantes dos isolados S150c, S54c e a fração >30kDa do isolado S54c possuem sensibilidade à proteinase K, quimiotripsina. A fração entre os 3-30kDa é degradada pela proteínase K, mas não pela quimiotripsina (**Anexo III**). Para o sobrenadante de ambos os isolados, S54c e S150c, e para as frações do sobrenadante do isolado S54c não houve qualquer inibição pela enzima α -amilase.

Estes resultados indicam que a atividade antibacteriana se deve à presença de moléculas de natureza proteica, indicando que serão BLIS, ou seja, *bacteriocin-like inhibitory substances*. Por serem de natureza proteica, estes BLIS, podem ser considerados bio conservantes seguros, pois são facilmente degradados por protéases no trato gastrointestinal. As enzimas digestivas inativam as bacteriocinas, assim, estas não podem alterar a flora intestinal.

A não inibição da atividade pela quimiotripsina da molécula ativa presente na fração entre os 3-30kDa, poderá indicar a presença de uma molécula de natureza proteica mais específica, ou então que a molécula poderá não ser proteica. A maioria dos autores (Bizani & Brandeli, 2002; Aunpad & Na-Bangchang, 2007 e Salum *et al*, 2012) referencia a existência de inibição da atividade das BLIS pelas enzimas testadas neste trabalho. Contudo, Singh *et al*, 2012 refere a caracterização de uma bacteriocina produzida por *Brevibacillus* que não é hidrolisada, pela proteinase K e quimiotripsina. Estes dados podem afastar, de certo modo, a probabilidade da fração entre 3-30kDa ser de natureza não proteica.

Tabela 10. Efeito das enzimas hidrolíticas na atividade antibacteriana.

Enzimas /controles	S150c	S54c	S54c	S54c
	(Sobrenadante)	(Sobrenadante)	(>30kDa)	(3-30kDa)
	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade
Proteinase K	-	-	-	-
Quimiotripsina	-	-	-	+
α-amílase	+	+	+	+
C1	+	+	+	+
C2	+	+	+	+
C3	-	-	-	-

Foram aplicados 1mg/mL de enzima nos sobrenadantes dos isolados S54c e S150c. Na fração entre os 3-30kDa do isolado S54c aplicou-se 20 mg/mL de enzima. C1 – Sobrenadante livre de células; C2- Sobrenadante + tampão sódio fosfato 50mM pH 7.4; C3: tampão sódio fosfato 50mM pH 7.4 + enzima.

Depois de analisados os resultados verificou-se que a atividade recolhida no sobrenadante do isolado S150c é menor do que a recolhida no sobrenadante do isolado

S54c. Com base nestes resultados, o isolado S54c foi selecionado para uma caracterização mais aprofundada da atividade antibacteriana.

4.6 – Purificação parcial

Depois de realizada a cromatografia de exclusão molecular, testaram-se as frações recolhidas contra *M.luteus* pelo método em difusão em agar. Verificou-se, que existia atividade nas frações 5 (23,90 mL) e 6 (28,30 mL), estas duas frações foram testadas juntas, produzindo um halo de inibição com cerca de 110 mm (**figura 10**). Para as restantes frações não se visualizou qualquer halo de inibição.

Durante as diversas etapas de purificação do sobrenadante de cultura do isolado S54c, realizou-se a quantificação da proteína total (**tabela 11**).

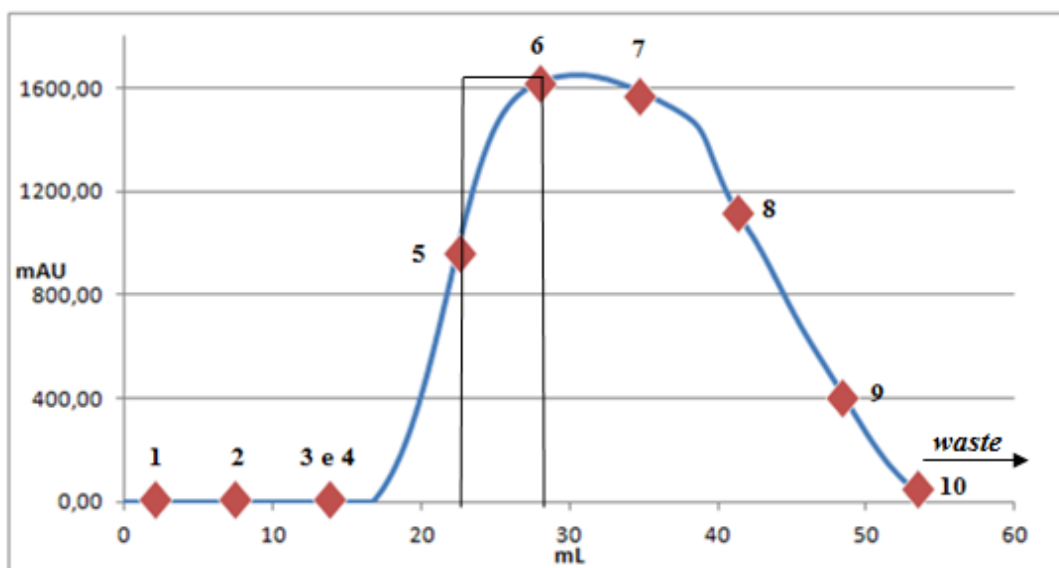


Fig.10 – Perfil de eluição do sobrenadante liofilizado do isolado S54, numa Sephacryl 200. Frações eluídas: **1** (2,05 mL); **2** (9,04); **3** (16,04 mL); **4** (16,90mL); **5** (23,90mL); **6** (28,30mL);**7** (35,30 mL); **8** (42,30 mL); **9** (49,30 mL); **10** (53,90 mL). As barras negro representam a fração positiva.

Posteriormente realizou-se uma cromatografia de troca iónica com as frações ativas contra *M.luteus*. Contudo depois de testar todas as frações recolhidas, não obtivemos qualquer halo de inibição. Podem colocar-se várias hipóteses para o possível desaparecimento da atividade. Uma das hipóteses poderá estar relacionada com a baixa concentração da molécula ativa nas frações testadas, que serão inferiores à concentração inibitória mínima (MIC). Uma outra hipótese poderá ser a adsorção por parte das proteínas ativas em relação à coluna de cromatografia, dificultando o processo de eluição. Este fenómeno pode também ter-se verificado nas membranas dos tubos *Centricon*, durante o processo de concentração das frações entre as duas cromatografias e na concentração final das frações recolhidas da cromatografia de troca iónica. Para finalizar a purificação desta molécula ativa será necessário recorrer a outras técnicas de concentração e de purificação, como por exemplo HPLC (*High-performance liquid chromatography*).

Tabela 11. Quantificação da proteína total do sobrenadante do isolado S54c durante as várias etapas de purificação.

Fração	Quantificação da proteína total (mg/mL) *
Sobrenadante	209,5
Sobrenadante liofilizado	101,4
>30 kDa	39,8
3-30 kDa	35,0
Fração 5 e 6 da cromatografia de exclusão molecular.	25,8

*todas as quantificações realizadas partiram de um volume inicial de 50 mL de sobrenadante de cultura do isolado S54c.

4.7 -SDS-PAGE

Para melhor entender o perfil de bandas das frações ativas recolhidas na cromatografia de exclusão molecular, realizou-se um gel SDS-PAGE de poliacrilamida 14%. Verificou-se que existem proteínas acima dos 25 kDa, podendo estas ser alguma das moléculas ativas identificadas no sobrenadante do isolado S54c- (**figura 11**). O elevado número de proteínas de massas diferentes indica que houve um fracionamento do sobrenadante mas não foi possível obter uma molécula pura.

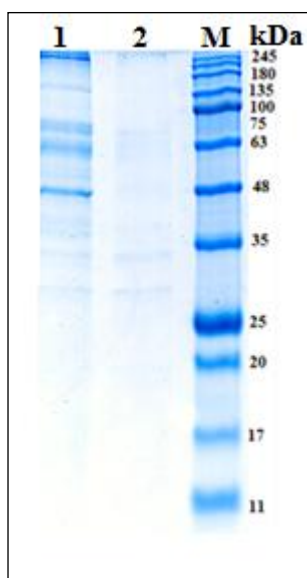


Fig.11- Gel SDS-PAGE 14% de poliacrilamida: **1 e 2** (fração 5 e 6 da exclusão molecular a 50mg/mL); **M**- marcador molecular.

4.8- Amplificação e Sequenciação de um fragmento do gene 16S do isolado S54c

A utilização dos primers específicos B-K1/F e B-K1/R, permitiram a amplificação de um fragmento com o tamanho esperado de 1114 pb. Na **figura 12**, podemos visualizar a banda do 16S esperada em todas as amostras do isolado S54c.

A análise da sequência consenso (**Anexo IV**) obtida para o fragmento do gene 16S mostrou elevada homologia (99% de identidade) com o gene 16S de várias estirpes

de *B. cereus* (tabela 12) Este resultado confirma a identificação do isolado S54c como uma estirpe de *B. cereus*.

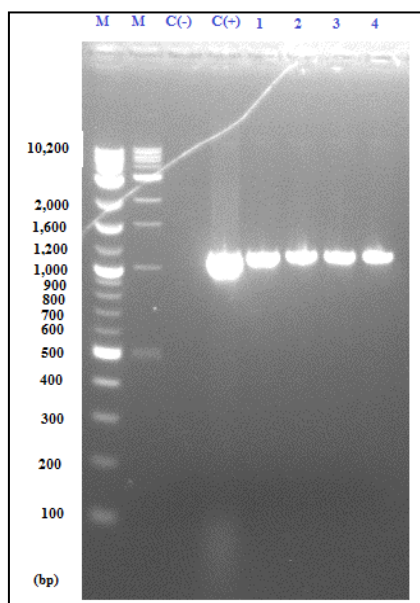


Fig.12 - Gel agarose 1,5% dos produtos de PCR. **M** – marcador molecular 100 bp; **M**- marcador molecular 1 kb; **C (-)** - controle negativo; **C (+)** - controle positivo isolado 160 A; **1,2,3 e 4** – isolado S54c.

Tabela 12- Homologia da sequência consenso do gene 16S do isolado S54c

Descrição	Score Total	Valor E	Identidade	Número de acesso
<i>Bacillus cereus</i> SS263-34	1905	0,0	99%	<i>JX429824.1</i>
<i>Bacillus cereus</i> NSPA8 16S	1905	0,0	99%	<i>KC686835.1</i>
<i>Bacillus cereus</i> KBY-5	1905	0,0	99%	<i>KC491185.1</i>

5. CONCLUSÕES GERAIS

Duas estirpes de *Bacillus* (S54c e S150c) isolados a partir do solo dos Açores, mais precisamente da ilha de S.Miguel, mostraram ter atividade antibacteriana. As condições de crescimento dos dois isolados foram otimizadas para obtenção de atividade antibacteriana em culturas líquidas. A maior atividade foi obtida em culturas com meio *Brain Heart Infusion*, 18 horas de incubação, a 30°C a uma agitação de 190 rpm.

As moléculas ativas produzidas pelas bactérias mostraram ter uma elevada estabilidade térmica, mantendo atividade após tratamentos a 100°C. Tendo em conta a sensibilidade das moléculas ativas a enzimas proteolíticas, pode concluir-se que as moléculas ativas são de natureza proteica, podendo ser classificada como *bacteriocin-like inhibitory substances*. Estas características mostram ter interesse para o processamento de alimentos, pois muitos dos processos envolvidos neste tipo de indústria utilizam elevadas temperaturas para confecionar ou conservar os alimentos, o que tem vindo a ser um problema para a maioria dos BLIS ou bacteriocinas descobertos até hoje, pois a partir de determinadas temperaturas perdem a sua atividade.

Os isolados S54c e S150c quando testados pelo método de Moujir *et al*, 2012 para bactérias esporulantes mostra atividade contra *Staphylococcus aureus* e MRSA (IH1), sendo que o isolado S54c mostra uma atividade superior à do isolado S150c. O espectro de atividade do sobrenadante do isolado S54c foi determinado pelo método de difusão em agar contra várias bactérias indicadoras, e mostrou existir atividade contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. A análise da sequência consenso do 16S do isolado S54c confirmou a identificação deste isolado como uma estirpe de *Bacillus cereus*.

O isolado S54c mostrou produzir duas moléculas diferentes e ambas com elevada atividade antimicrobiana, uma presente na fração entre 3-30 kDa e outra na >30 kDa. A molécula presente na fração entre os 3-30 kDa mostrou elevada estabilidade térmica, mantendo-se ativa mesmo após tratamento a 121°C e não é degradada pela quimiotripsina. A molécula presente na fração >30 kDa mostrou uma estabilidade térmica até aos 100°C e é hidrolisada pelas enzimas proteinase K e quimiotripsina.

O fracionamento parcial das moléculas ativas produzidas por S54c em cromatografia de exclusão molecular permitiu a identificação de um fração ativa. Esta fração poderá ser purificada por técnicas cromatográficas, permitindo a posterior caracterização por espetrofotometria de massa, a sequenciação N-terminal, a determinação da concentração mínima inibitória, bem como, estudos do modo de ação.

A hipótese de substituição do uso de antibióticos por estas moléculas com atividade para combater bactérias resistente ou multi-resistentes, utilização no bio-controlo e na indústria alimentar, são finalidades de grande relevância para a evolução do mundo das bacteriocinas e também para a medicina em geral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL H, FRANZ C M A P, OMAR N B, GÁLVEZ A (2011). Diversity and Applications of *Bacillus* Bacteriocins. *FEMS Microbiol Review*; 35:201-232.

AUNPAD R & NA-BANGCHANG K (2007). Pumilicin 4, A Novel Bacteriocin with Anti-MRSA and Anti-VRE Activity Produced by Newly Isolated Bacteria *Bacillus pumilus* Strain WAPB4. *Current Microbiology*; 55: 308-313.

BISWAS S R, RAY P, JOHNSON M C, RAY B (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici*. *H. Applied Environmental Microbiology* 57:1265-1267.

BIZANI D & BRANDELLI A (2002). Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Strain 8A. *Journal of Applied Microbiology*. 93:512-519.

BIZANI D & BRANDELLI A (2004). Influence of media and temperature on bacteriocins productions by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. *Journal of Applied Microbiology*. 65:158-162.

CLADERA-OLIVERA F, CARON G R, BRANDELLI A (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. 38:251-256.

CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, CHIKINDAS M L (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71:1-20.

EIJSINK V G H, AXELSSON L, DIEP D B, HAVARSTEIN L S, HOLO H, NES I F (2002). Production of Class II Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria; An Example of Biological Warfare and Communication. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81:639-654.

GUO Y, YU Z, XIE J, ZHANG R (2012). Identification of a New *Bacillus licheniformis* Strain Producing a Bacteriocin-Like Substance. *The Journal of Microbiology*; 50(3):452-458.

HEUNIS T, BSHENA O, KLUMPERMAN B, DICKS L (2011). Release of Bacteriocins from Nanofibers Prepared with Combinations of Poly(D,L-lactide)(PDLA) and Poly(Ethylene Oxide) (PEO). *International Journal of Molecular Science*.12:2158-2173.

KAMOUN F, FGUIRA I B, HASSEN N B B, MEJDOUB H, LERECLUS D, JAOUA S (2011). Purification and Characterization of a New *Bacillus thuringiensis* Bacteriocin Active Against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Applied Biochemical Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-011-9252-9

KINDOLI S, LEE H A, KIM J H (2012). Properties of Bac W42, a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* W42 Isolated from *Cheonggukjang*. *Journal Microbiology. Biotechnology*. 22(8):1092-1100.

LEE H & KIM H (2011). Lantibiotics, Class I Bactriocins from Genus *Bacillus*. *Journal Microbiology Biotechnology*; 21(3): 229-235.

MAQUEDA M, SÁNCHEZ-HIDALGO M, FERNÁNDEZ M, MONTALBÁN-LÓPEZ M (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Review*.32:2-22.

MCMULLEN L M, STILES M E (1996). Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot., Ames, suppl.* 64-71.

MILLIS S, STANTON C, HILL C, ROSS R P (2011).New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Annual Review Food Science Technology* 2:299-329.

MOLL G N, KONINGS W N & DRIESSEN (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76:185-198.

MONTVILLE T J, CHEN Y (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin:recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology Biotechnology*. 50:511-519.

MOUJIR L L, CABRAL C, BARRETO M C (2012). *Determination of antimicrobials activities*. In: Barreto, M.C. & Simões, N. (eds), *Determination of Biological Activities. A laboratory Manual*, pp.5-25.Universidade dos Açores, Ponta Delgada.

OSCÁRIZ J C, CINTAS L, HOLO H, LASA I, NES I F, PISABARRO A G (2005). Purification and Sequencing of cerein 7B, a Novel Bacteriocin Produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiology Letters*. 254: 108-115.

PARENTE E, RICCIARDI A, ADDARIO G (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 104 NWC during batch fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology* 41:388–394.

RYAN M P, REA M C, HILL C, ROSS R P (1996). An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147. *Appl. Environmental Microbiology*. 62(2):612-619.

RILEY A & WERTZ J E (2002). BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.*; 56:117-137.

SALUM K, LEE H A, KIM J H (2012). Properties of Bac W42, a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* W4 Isolated from Cheonggukjang. *Journal Microbiology Biotechnology*. 22(8):1092-1100.

SHARMA N & GAUTAM N (2007). Antibacterial Activity and Characterization of Bacteriocin of *Bacillus mycoides* Isolated from Whey. *Indian Journal of Biotechnology*. 7:117-121.

SINGH P K, CHITTPURNA, ASNISH, SHARMA V, PATIL P B, HORPOLE SURESH (2012). Identification, Purification and Characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus* sp. Strain GI-9. *PLoS ONE*. 7(3): E31498.

SCHULZ D, PEREIRA M A, BONELLI R R, NUNES M M, BATISTA C R V (2003). Bacteriocins: Mechanism of Action and use in Food Preservation. *Alim. Nutr. Araraquara*. 14(2): 229-235.

SCHULZ D, BONELLI R R, BATISTA C R V (2005). Bacteriocins Produced by *Bacillus* spp. to Conservation and Food Processing. *Alim. Nutr. Araraquara*. 16(4): 403-411.

STADEN, ANTON DU PEREZ VAN (2011). Developing bone cement implants impregnated with bacteriocins for prevention of infections.

TAGG J R & MCGIVEN A R (1971). Assay System for Bacteriocins. *Applied Microbiology*. 21(5): 943.

VUYST L D & LEROY F (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*.13:194–199.

WU X, WALKER M J, HORNITZY M, CHIN J (2006). Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiology Methods*. 64: 107-119.

ANEXOS

Anexo I

Resultados

- Espectro de atividade do S54c

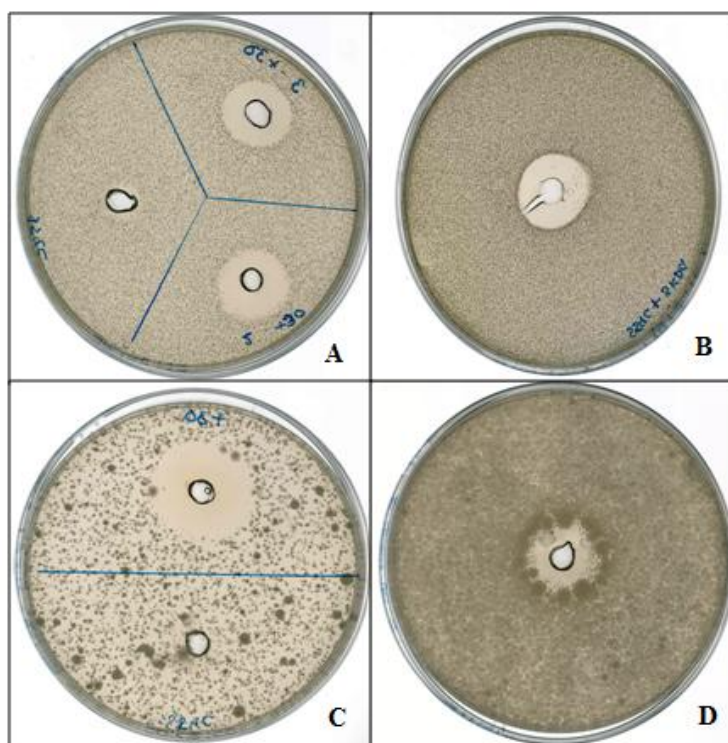


Fig.1 – **A-** *M.luteus* >30 kDa; **B-** *M.luteus* 3-30 kDa; **C-** *B.cereus* >30 kDa; **D-** *B.cereus* 3-30 kDa.

Anexo II

Resultados

- Estabilidade térmica

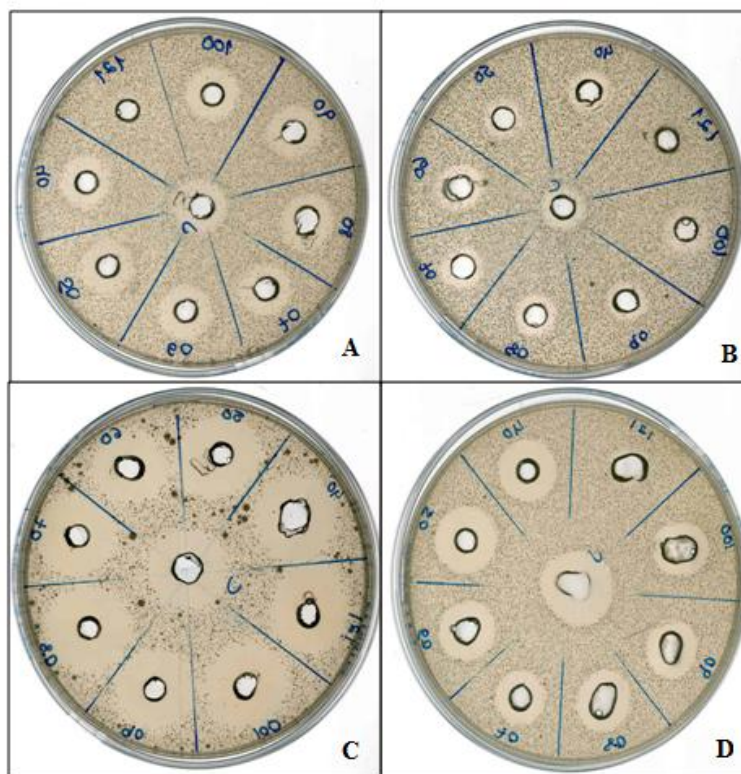


Fig.2 – Estabilidade térmica. Foram testadas diversas amostras às seguintes temperaturas: 40°C, 50°C, 60°C,70°C,80°C,90°C e 100°C por 30 minutos; 121°C por 20 minutos. **A-** Sobrenadante do isolado S54c livre de células; **B-** Sobrenadante do isolado S150c livre de células; **C-** Sobrenadante livre de células do isolado S54c >30 kDa; **D-** Sobrenadante livre de células do isolado S54c entre os 3-30 kDa. Todas estas frações foram testadas com a bactéria indicadora *M.luteus*.

Anexo III

- Ação enzimática

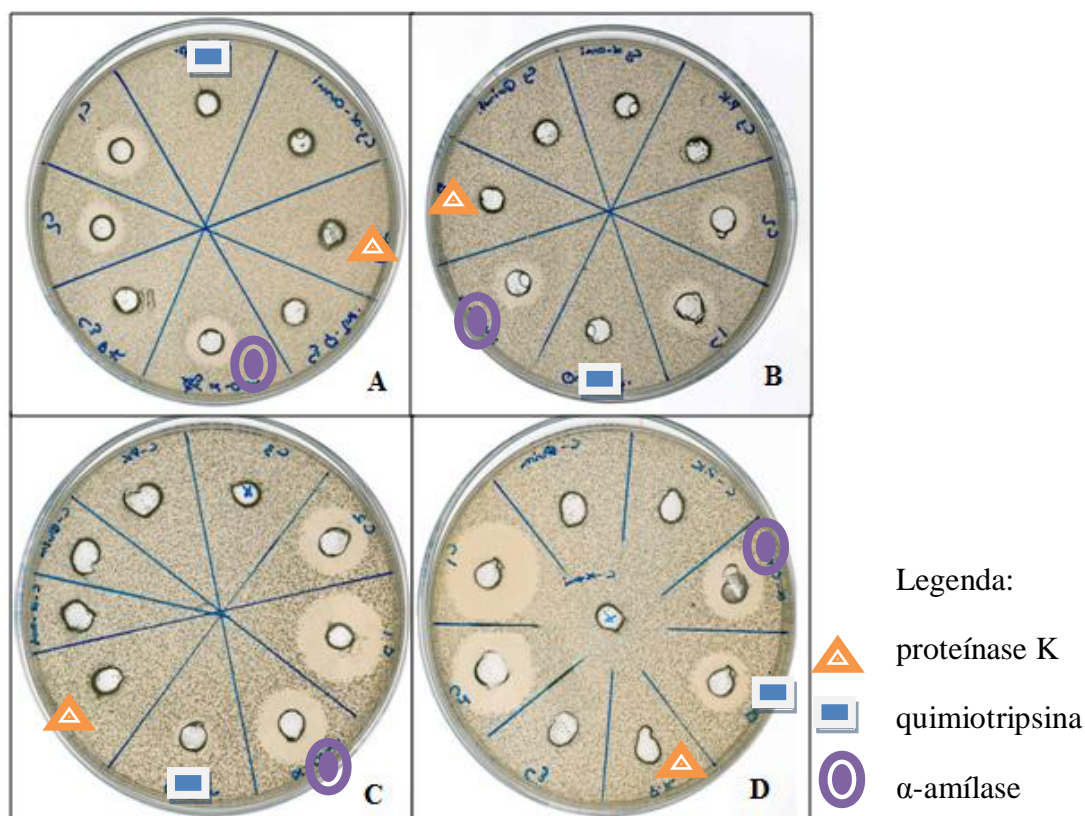


Fig.3 – Ação enzimática dos respetivos sobrenadantes foi testada, utilizaram-se as seguintes enzimas: proteínase K 40mg/mL, quimi tripsina 40mg/mL e α-amílase 100mg/mL. Foram aplicados 1mg/mL de enzima nos sobrenadantes dos isolados S54c e S150c. Na fração entre os 3-30kDa do isolado S54c aplicou-se 20 mg/mL de enzima. C1 – Sobrenadante livre de células; C2- Sobrenadante + tampão sódio fosfato 50mM pH 7.4; C3: tampão sódio fosfato 50mM pH 7.4 + enzima. **A-** Sobrenadante do isolado S54c livre de células; **B-** Sobrenadante do isolado S150c livre de células; **C-** Sobrenadante livre de células do isolado S54c >30 kDa; **D-** Sobrenadante livre de células do isolado S54c entre os 3-30 kDa. Todas estas frações foram testadas com a bactéria indicadora *M.luteus*.

Anexo IV

Resultados

- Sequência consenso:

GATCGGCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACATCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGCTTTCGGGTC
GTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACC
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTT
TCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTATAGTCTGAAG
TTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAG
GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCT
CAGTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGAATCGC