

Sara Isabel Goulart Machado

Estudo de atividades antimicrobianas em bactérias
do género *Bacillus* isoladas nos Açores: otimização
das condições de produção, identificação e
caracterização de bacteriocinas



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2015

Sara Isabel Goulart Machado

Estudo de atividades antimicrobianas em bactérias
do género *Bacillus* isoladas nos Açores: otimização
das condições de produção, identificação e
caracterização de bacteriocinas

Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Orientadora: Doutora Carla Manuela Machado Mendes Leite Cabral



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2015

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com o apoio de várias pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para a sua realização. Gostaria de expressar o meus mais profundo e sincero agradecimento de forma especial:

- À Professora Doutora Carla Mendes Cabral, orientadora deste trabalho. Agradeço toda a disponibilidade, paciência, compreensão e toda a sabedoria, conhecimento e orientação científica transmitidos durante todo este trabalho. As suas orientações foram cruciais para a sua execução. Agradeço todo o tempo que disponibilizou, pelo interesse que mostrou no meu trabalho e pela motivação que deu ao longo do tempo. Foi um privilégio ser sua orientanda. Expresso o meu sincero agradecimento.
- Ao Doutor Duarte Toubarro, um agradecimento muito especial. Agradeço a disponibilidade para me ajudar numa etapa essencial do trabalho, que sem a sua ajuda não teria sido possível realizar. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos, que enriqueceram o meu trabalho. Expresso um sincero agradecimento.
- Ao Professor Doutor Nelson Simões, chefe de equipa de investigação, por me ter acolhido nos laboratórios do Departamento de Biologia onde foi desenvolvido o trabalho de investigação. Muito obrigado.
- Ao técnico Pedro Mântua, pelo apoio que prestou no trabalho de laboratório e pela sua disponibilidade em ajudar. Muito obrigado.
- Ao Ricardo, queria agradecer todo o apoio que me deu durante estes meses de árduo trabalho, pelo incentivo e motivação. Um muito obrigado.
- Quero agradecer à minha família, em especial aos meus pais, irmãos e avós, pelo seu apoio incondicional. E que apesar da distância que nos separa sempre acreditaram em mim e deram todo o apoio e incentivo para realizar este trabalho. Sem vocês não teria sido possível. Muito Obrigado

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Bacteriocinas	3
1.1.1 Bacteriocinas de bactérias lácticas (LAB).....	6
1.1.2 Bacteriocinas de <i>Bacillus</i> , BLIS e classificação	8
1.2 Bacteriocinas de <i>Bacillus sp.</i>	10
1.2.1 <i>Bacillus licheniformis</i>	10
1.3 Síntese de bacteriocinas	11
1.4 Aplicações	14
1.4.1 Aplicações na alimentação	14
1.4.2 Aplicações na saúde animal	15
1.4.3 Aplicações ambientais	16
1.4.4 Aplicações na saúde humana.....	16
2 PERTINÊNCIA E OBJETIVOS DO TRABALHO	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Culturas bacterianas	20
3.2 Meios de cultura	22
3.3 Otimização das condições de crescimento dos isolados de <i>Bacillus sp.</i>	23
3.4 Atividade antimicrobiana dos isolados de <i>Bacillus sp.</i>	23
3.5 Preparação dos sobrenadantes das culturas bacterianas	24
3.6 Teste de atividade antimicrobiana.....	24
3.7 Concentração e fracionamento	25
3.8 Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas.....	25
3.9 Indução da atividade antimicrobiana de S114d.....	27
3.10 Extração de DNA	28
3.11 Condições e amplificação de um fragmento do gene 16S.....	28
3.12 Eletroforese em gel de agarose.....	29
3.13 Digestão enzimática e identificação dos perfis ARDRA	29
3.14 Purificação do produto de PCR.....	30
3.15 Sequenciação do DNA e análise	30
3.16 Purificação parcial S114d.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Seleção dos isolados de <i>Bacillus sp.</i>	32
4.2 Caracterização genética dos isolados de <i>Bacillus sp.</i> por ARDRA.....	32
4.3 Atividade antimicrobiana dos isolados de <i>Bacillus sp.</i>	33

4.4 Estudo das condições de crescimento em meio líquido	36
4.5 Concentração e fracionamento	41
4.6 Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas.....	42
4.7 Indução da atividade antimicrobiana de S114d.....	46
4.8 Purificação parcial.....	48
4.9 Amplificação e sequenciação de um fragmento do gene 16s do isolado S114d	51
5 CONCLUSÕES GERAIS	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
Anexos	60
Anexo I.....	60
Anexo II	61
Anexo III	62

RESUMO

Os *Bacillus sp.* produzem péptidos antimicrobianos incluindo bacteriocinas que são péptidos de síntese ribossomal. As bacteriocinas têm originado um grande interesse em várias áreas, desde a saúde humana até à indústria alimentar. Este trabalho teve como objetivo a seleção de 5 isolados de *Bacillus sp.* do Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores e a otimização das condições de crescimento e a maximização da produção da atividade antimicrobiana em meio líquido de 1 destes isolados, assim como a caracterização e purificação parcial das moléculas ativas. O isolado S114d apresentou atividade antimicrobiana em cultura líquida contra *M. luteus* quando incubado 18h, a 30°C em Brain Heart Infusion. Realizou-se o fracionamento e concentração do sobrenadante da cultura por ultrafiltração, constatando-se que 3 frações são ativas (3-10kDa, 10-30kDa e >30kDa). Verificou-se que as moléculas ativas das frações 3-10kDa e 10-30kDa apresentam estabilidade térmica a 121°C. A fração >30kDa apresenta diminuição da atividade a 121°C e a fração de sobrenadante livre de células perde atividade a temperaturas superiores a 80°C. Mostrou-se que as moléculas ativas presentes no sobrenadante são hidrolisadas pela proteinase K e pela tripsina. As frações concentradas apresentam resultados diferentes, sendo que as frações 3-10kDa e 10-30kDa são hidrolisadas pela tripsina e parcialmente pela proteinase K e a fração >30kDa é parcialmente hidrolisada pelas duas enzimas. Os resultados indicam que a atividade antimicrobiana é originada por moléculas de origem proteica e permitem classifica-las como BLIS (Bacteriocin-Like Inhibitory Substances) A adição de um indutor nas culturas líquidas de S114d mostrou que *Bacillus licheniformis* DSM13 ou os seus produtos metabólicos tem a capacidade de aumentar a produção de substâncias antimicrobianas. O sobrenadante concentrado do isolado S114d foi parcialmente fracionado por cromatografia de troca iónica, permitindo a identificação de frações ativas. A análise da sequência parcial do gene 16S permitiu identificar o isolado S114d como uma estirpe de *Bacillus licheniformis*. Este trabalho permitiu a otimização da produção de BLIS de S114 em cultura líquida. Foi possível a purificação parcial e caracterização de moléculas ativas com características diferentes das conhecidas em *B. licheniformis* e cujo potencial poderá ser explorado após a obtenção da molécula ativa pura.

Palavras-Chave: *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) Bacteriocina, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The *Bacillus sp.* produces antimicrobial peptides including bacteriocins, which are peptides of ribosomal synthesis. These substances have originated a large interest in various areas, from human health to the food industry. This work aimed to select five isolates of *Bacillus sp.* from Azorean spore forming bacteria collection that produce antimicrobial activity in liquid cultures, and the optimization of growing conditions and maximizing the production of antimicrobial activity in liquid medium of one of these isolates, as well as the characterization and partial purification of the active molecules. Isolate S114d presented antimicrobial activity in liquid culture against *M. luteus* when incubated 18h at 30 ° C in Brain Heart Infusion. The fractionation and concentration of the supernatant culture by ultrafiltration was carried out, showing that three fractions are active (3-10kDa, and 10-30kDa > 30kDa). It was found that the fraction with active molecules 3-10kDa and 10-30kDa exhibit thermal stability at 121 ° C. The fraction > 30kDa presents decreased activity at 121 ° C and the fraction of cell-free supernatant loses activity at temperatures above 80 ° C. It has been shown that active molecules in the supernatant are hydrolyzed by proteinase K and trypsin. The concentrated fractions showed different results, the 3-10kDa and 10-30kDa fraction are hydrolyzed by trypsin and partially by proteinase K and the fraction > 30kDa is partially hydrolyzed by both enzymes. The results indicate that antimicrobial activity is originated by protein molecules and allows classifying them as BLIS (Bacteriocin-like Inhibitory Substances). The addition of an inducer in liquid cultures of S114d showed that *Bacillus licheniformis* DSM13 or its metabolic products have the ability to increase the production of antimicrobial substances. The S114d concentrated supernatant was partially fractionated by ion exchange chromatography, allowing the identification of active fractions. The analysis of a partial sequence of the 16S gene allowed the identification of S114d isolate as a strain of *Bacillus licheniformis*. This work allowed the optimization of production of BLIS by S114d in liquid culture. Partial purification and characterization of active molecules was possible, revealing molecules with different characteristics of the known bacteriocins produced by *B. licheniformis*, and whose potential can be explored after obtaining the pure active molecule.

Keywords: *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS), Bacteriocin, antimicrobial activity.

1. Introdução

1.1. Bacteriocinas

Os péptidos antimicrobianos têm sido encontrados em quase todos os organismos vivos: procariotas, plantas e animais incluindo vertebrados e invertebrados. Estes possuem diversas estruturas químicas e tem um papel crucial na imunidade inata dos sistemas de defesa na proteção dos seus hospedeiros contra agentes patogénicos invasores (Lee e Kim 2011), (Benitez, et al. 2011) (Kayalvizhi e Gunasekaran 2008).

Uma grande variedade destes péptidos são produzidos por bactérias e têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de outros microrganismos, incluindo microrganismos resistentes a antibióticos que são cada vez mais frequentes. Os péptidos antimicrobianos apresentam novos mecanismos de resposta antimicrobiana no combate a infeções causadas por bactérias patogénicas resistentes. A resistência de bactérias patogénicas a antibióticos tem sido um dos maiores contratempos no tratamento de infeções bacterianas, pois existem novos mecanismos de resistência que são transmitidos entre espécies por mecanismos de transferência genética originando estirpes multirresistentes (Sebei, et al. 2007) (Mendo, et al. 2004) (Anthony, et al. 2009).

As bactérias produzem 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 bactericida (Riley e Wertz 2002).

Os antibióticos bacterianos podem ser divididos em dois tipos com base na sua natureza química: grupo I – antibióticos não péptidos como antibacterianos ou antifúngicos como a bacilosina produzida por *Bacillus subtilis*. Grupo II – antibióticos péptidos que se dividem em dois grandes grupos diferenciando-se através da via de biossíntese pelo quais são gerados. Um grupo compreende péptidos com síntese não ribossomal produzidos por largos complexos enzimáticos. Estes péptidos consistem em apenas alguns resíduos de aminoácidos, tendo como exemplo a surfactina produzida por várias estirpes de *B. subtilis* que é composta apenas por 7 aminoácidos. O segundo grupo compreende péptidos de síntese ribossomal que são as bacteriocinas (Sebei, et al. 2007) (Lee e Kim 2011) (Salcido, et al. 2012).

Normalmente são constituídas por cadeias de cerca de 30 a 60 aminoácidos e têm sido associadas a várias espécies de bactérias (Millis, et al. 2011).

As bacteriocinas são péptidos sintetizados no ribossoma, na sua maioria de dimensão relativamente pequena, entre 3 a 10 kDa, catiónicas, anfipáticas e hidrofílicas. Possuem sequência, estrutura, peso molecular, propriedades bioquímicas, mecanismos e espectros de ação variável (Benitez, et al. 2011), (Anthony, et al. 2009) (Serpil, et al. 2012) (Salcido, et al. 2008).

As bacteriocinas são estáveis ao calor e são ativas contra outras bactérias da mesma espécie (espectro estreito de atividade) ou contra outras espécies (amplo espectro de atividade) (Millis, et al. 2011) e geralmente a sua atividade é direcionada para espécies próximas ou do mesmo nicho ecológico (Martirani, et al. 2002). Alguns péptidos exibem um espectro de ação contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, protozoários, leveduras, fungos e vírus (Anthony, et al. 2009).

As bacteriocinas são produzidas por bactérias dos géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus*, frequentemente a níveis muito elevados dentro de uma população e exibem níveis de diversidade proteica extraordinários, sendo o sistema de defesa mais abundante em microrganismos (Kamoun, et al. 2011) (Shelburne, et al. 2007) (Kayalvizhi e Gunasekaran 2008).

A maioria das linhagens bacterianas produzem pelo menos uma bacteriocina como parte do seu mecanismo de defesa (Singh, et al. 2012), sendo que uma espécie de bactéria pode produzir vários tipos de bacteriocinas (Motta e Brandelli 2007). A bactéria produtora não é sensível às suas próprias bacteriocinas (Salum, Lee e Kim 2012) possuindo um sistema de proteção contra as suas próprias bacteriocinas, designando-se por imunidade. Estas produzem proteínas que se ligam à membrana da bactéria produtora, impedindo a atividade da bacteriocina (Rosa, et al. 2002).

Geralmente as bacteriocinas atuam nas membranas celulares, despolarizando a membrana da célula, inibindo a síntese da parede celular ou formando poros que levam ao efluxo de pequenas moléculas citoplasmáticas, iões da célula alvo e ao colapso da força protónica (PMF) que levam a morte celular. As diferentes formas de ação destes péptidos antimicrobianos podem levar à resolução dos problemas relacionados com o desenvolvimento de resistência a antibióticos (Anthony, et al. 2009) (Kamoun, et al. 2011).

Existem dois mecanismos de ação de bacteriocinas mais conhecidos (Figura 1). No primeiro modelo que é comum à maioria das bacteriocinas, em particular aquelas que

inibem bactérias Gram-positivas, tem como alvo o envelope celular. Algumas bacteriocinas de classe I inibem o lípido II presente na membrana celular, anulando assim a síntese de peptidoglicano. O segundo mecanismo de ação consiste na formação de poros que inibem ou matam as bactérias alvo. A lactococcina A, bacteriocina classe II liga-se aos recetores do sistema manose-fosfotransferase formador de poros (Man-PTS).

A nisina e algumas bacteriocinas da classe I possuem estes dois mecanismos de ação, tendo a capacidade de inibir a síntese de peptidoglicano e de formar poros (Cotter, et al. 20013).

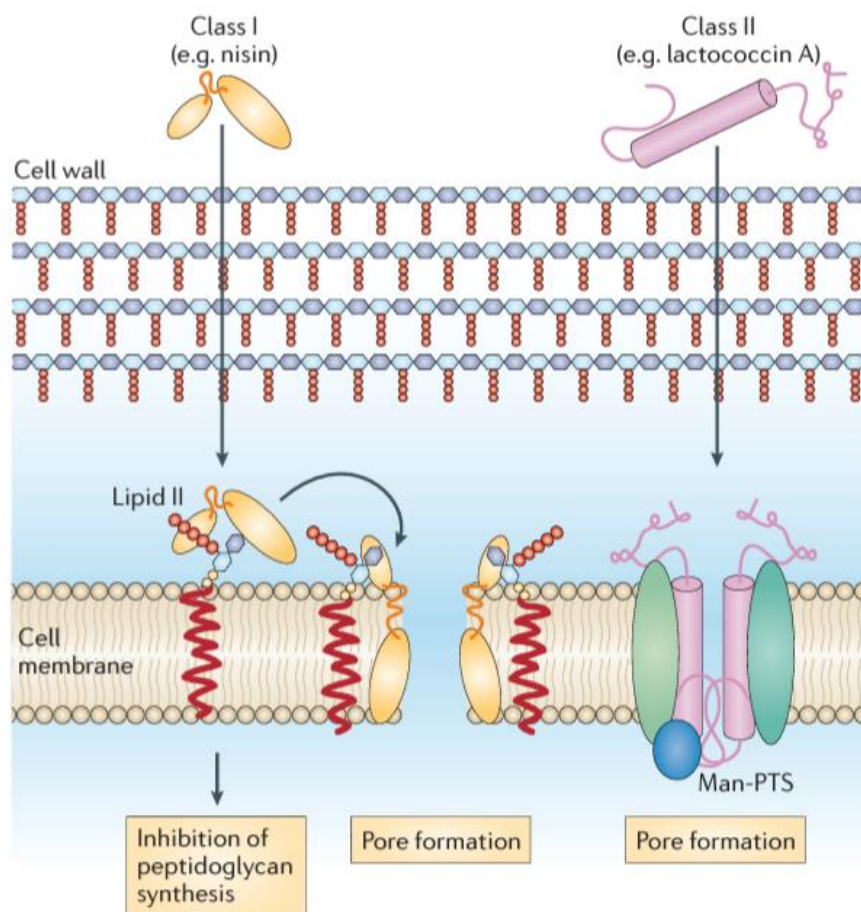


Figura 1: Mecanismos de ação bacteriocinas. Bacteriocinas classe I: inibição da síntese de peptidoglicano. Bacteriocinas classe II: formação de pores na membrana celular (Cotter, et al. 2013).

As bacteriocinas são diferentes dos antibióticos usados em medicina convencional porque estes são sintetizados por complexos multienzimáticos e que geralmente são

considerados metabolitos secundários das células. Bacteriocinas e antibióticos diferem de forma crítica (Riley e Wertz 2002) (Salum, et al. 2012).

Recentemente, as bacteriocinas têm ganho atenção como uma alternativa terapêutica contra agentes patogênicos resistentes e bactérias causadores de deterioração alimentar (Anthony, et al. 2009) (Singh, et al. 2012). As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas têm sido vastamente estudadas devido ao seu potencial uso como bioconservante na indústria alimentar e por serem geralmente consideradas seguras – GRAS (Generally Recognized As Safe) (Bizani e Brandelli 2004) (Cladera-Olivera, et al. 2004) (Abriouel, et al. 2011).

1.1.1. Bacteriocinas de bactérias lácticas (LAB)

As bactérias lácticas são conhecidas por produzirem ácido láctico. Estas bactérias são Gram-positivas, tolerantes ao ácido e na generalidade não são esporulantes. As LAB são frequentemente encontradas em iogurtes, queijo, kimchi (condimento asiático) na vagina e trato gastrointestinal dos humanos e animais, tendo consequências benéficas na saúde humana (Jeong, et al. 2015).

As LAB tem sido usadas durante vários séculos na fermentação de vários alimentos. A incorporação de bacteriocinas como bioconservante nos modelos de sistema alimentar tem sido extensivamente estudada e foi demonstrado a sua eficiência no controlo de microrganismos causadores de patogenicidade e deterioração dos alimentos. As LAB também podem ser consideradas como culturas protetoras porque melhoram a qualidade microbiológica, bem como a segurança dos alimentos e podem ser uma forma de impedir deterioração (Fernández, et al. 2010).

A nisina tem sido uma das bacteriocinas mais estudadas e sabe-se que a produção de bacteriocinas é influenciada pelas condições de crescimento como temperatura, pH e composição do meio (Kayalvizhi e Gunasekaran 2008) (McCullen e Stiles 1996) (Dobson, et al. 2012).

O objetivo de se utilizar estes inibidores de natureza proteica para aumentar a qualidade microbiana e segurança alimentar estimulou muitos estudos ao longo dos últimos anos, recebendo o estatuto de GRAS – Generally Recognized As Safe (Ryan, et al. 1996) (Schulz, et al. 2003) (Millis, et al. 2011).

As bacteriocinas de LAB podem ser classificadas em quatro classes. Estas diferem nos seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. A maioria das bacteriocinas possui um ponto isoelétrico elevado e contêm regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (McCullen e Stiles 1996).

- classe I – lantibióticos, o nome deriva de modificações pós-tradução caracterizadas pela presença de lantionina e β -metil lantionina (Riley e Wertz 2002) (Lee e Kim 2011).

Formam poros instáveis e têm atividade contra bactérias Gram-positivas intimamente relacionadas e normalmente não tem atividade contra as bactérias Gram-negativas. São de tamanho relativamente pequeno 3-10kDa. Os lantibióticos tem sido a classe de bacteriocinas mais estudada com vastas aplicações terapêuticas e na preservação de alimentos na indústria alimentar (Lee e Kim 2011) (Singh, et al. 2012) (Sebei, et al. 2007) (Caetano, et al. 2011).

- Classes II- são moléculas pequenas (<10 kDa) e estáveis ao calor, não possuem lantionina (Sebei, et al. 2007).

Podem ser divididas em três grupos

- Classe IIa, são péptidos ativos contra a *Listeria*, com sequência N-terminal definida Y-G-N-G-V-X-C;
- Classes IIb, bacteriocinas compostas por dois péptidos, sendo necessários ambos as componentes para ter atividade antimicrobiana (Lee e Kim 2011)
- Classe IIc, são péptidos com tiol ativado que requerem resíduos de cisteína reduzidos para que sejam ativos. As bacteriocinas deste grupo dependem de fosfolípidos aniônicos e recetores para a interação inicial com a membrana. (Lee e Kim 2011) (Schulz, et al. 2003) (Sebei, et al. 2007) (Caetano, et al. 2011).
- Classe III – estas bacteriocinas são de maior dimensão (> 30 kDa) e são termolábeis (Lee e Kim 2011).
- Classe IV – bacteriocinas complexas que contêm porções compostas por lípidos ou hidratos de carbono para além da porção proteica, essenciais à atividade. Apenas se conhece um número reduzido de bacteriocinas classificadas pertencentes a estes dois últimos grupos (Lee e Kim 2011) (Schulz, et al. 2003).

As semelhanças entre as bacteriocinas de LAB e de outras bactérias Gram positivas são grandes, pelo que se adotou esta classificação para as substâncias produzidas por outras bactérias Gram-positivas, não sendo uma classificação definitiva (Schulz, et al. 2003).

1.1.2. Bacteriocinas de *Bacillus*, BLIS e classificação

As bactérias pertencentes ao género *Bacillus* são bastonetes Gram-positivos, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e formam endósporos, produzem catalase e tem uma distribuição ubíqua. São encontrados em diversos ambientes como solo, argilas, rochas, poeiras, ambientes aquáticos, vegetação, comida e trato gastrointestinal de vários insetos e animais. Esta capacidade de sobrevivência e crescimento em diferentes ecossistemas é baseada na produção de robustos endósporos, nas suas diversas propriedades fisiológicas e nas necessidades de crescimento. As espécies de *Bacillus sp.* são genética e fenotipicamente heterogêneas e conseqüentemente exibem diversas propriedades fisiológicas como a capacidade de degradar diferentes substratos derivados de plantas e de fontes animais incluindo celulose, amido, proteínas, agar, hidratos de carbono e bio-fuéis. O género *Bacillus* tem sido amplamente usado na indústria da fermentação para a produção de antibióticos e de enzimas extracelulares (Mendo, et al. 2004) (Abriouel, et al. 2011) (Lee e Kim 2011) (Wu, et al. 2006) (He, et al, 2006).

Os membros do grupo *Bacillus sp.* senso lato são considerados bons produtores de substâncias antimicrobianas incluindo antibióticos peptídicos, lipopéptidos e bacteriocinas. A produção de substâncias antimicrobianas e a capacidade de esporulação conferem aos *Bacillus sp.* uma dupla vantagem de sobrevivência em diferentes habitats (Abriouel, et al. 2011) (Wu, et al. 2006).

Existem substâncias antimicrobianas que não estão bem caracterizadas e que são conhecidas como Bacteriocin Like Inhibitory Substances (BLIS). Este termo é usado quando a natureza peptídica do composto antimicrobiano não está confirmada. No caso dos *Bacillus sp.* é importante corroborar a síntese ribossomal das verdadeiras bacteriocinas, porque este grupo de bactérias é prolífico na produção de péptidos antimicrobianos (lipopeptidos) por síntese não ribossomal (iturinas entre outras) (Abriouel, et al. 2011).

A produção de bacteriocinas ou BLIS já foi descrita para algumas espécies do género *Bacillus* como o *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, e para espécies de géneros próximos como *Geobacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*. Algumas 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 e Brandelli 2004) As bacteriocinas mais estudadas no género *Bacillus* são a subtilina e a subtilosina A (Lee e Kim 2011) (Saleem, et al. 2009).

Bacteriocinas do género *Bacillus* podem ser consideradas como as segundas mais importantes a seguir às bacteriocinas produzidas por LAB. As estirpes deste género produzem um arranjo diversificado de péptidos antimicrobianos com diferentes bases de estrutura química. A falta de informação relativa a sequência de aminoácidos ou a diversidade destes péptidos levam a que ainda não exista um esquema de classificação claro quanto às BLIS (Abriouel, et al. 2011).

Devido ao enorme aumento do número de bacteriocinas descritas para o género *Bacillus*, foi proposta uma nova classificação das bacteriocinas por Abriouel et al, 2010, como podemos verificar na Tabela 1 (Abriouel, et al. 2011).

- Classe I - inclui péptidos com diferentes tipos de modificações pós- tradução. Pode ser dividida em 4 subclasses.
 - subclasses I.1., I.2. e I.3 - podemos encontrar péptidos com modificações semelhantes aos lantibióticos.
 - I.4. inclui modificações únicas da subtilosina A
- Classe II - encontram-se pequenos péptidos, sintetizados no ribossoma, lineares, estáveis ao calor e ao pH e que não possuem modificações. Esta classe divide-se em três subclasses.
 - subclasse II.1 - inclui péptidos semelhantes a pediocina
 - subclasse II.2 - inclui péptidos semelhantes a thuricina
 - subclasse II.3 - abrange outros péptidos lineares
- Classe III - compreende as grandes proteínas

Nem todas as bacteriocinas produzidas por *Bacillus sp.* estão incluídas nesta classificação por ainda não estarem estudadas ao pormenor, ficando com a denominação de BLIS (Abriouel, et al. 2011).

Tabela 1: Proposta de classificação das bacteriocinas de *Bacillus sp.* (Abriouel, et al. 2011).

Bacteriocinas de <i>Bacillus sp.</i>	Exemplos
Classe I. péptidos modificados Pós-tradução	
Subclasse I.1. péptidos simples lantibióticos elongados	Subtilina, ericina S e A
Subclasse I.2. péptidos simples lantibióticos	Sublancina-168 mersacidina
Subclasse I.3. dois péptidos de lantibióticos	Haloduracina
Subclasse I.4. outros péptidos modificados pós- transcrição	Subtilosina A
Classe II. Péptidos não modificados	
Subclasse II.1. Pediocin-like peptides	Coagulina
Subclasse II.2. Thuricin-like peptides	Turicina H, turicina S
Subclasse II.3. outros péptidos lineares	Cereína 7 ^a
Classe III. Grandes proteínas	Megacina A-216

1.2. Bacteriocinas de *Bacillus sp.*

1.2.1. *Bacillus licheniformis*

O *Bacillus licheniformis* é uma bactéria Gram-positiva, produtora de endósporos comumente encontrada no solo. Os membros deste gênero tem sido descritos como produtores de componentes com grande importância na área da biotecnologia e na indústria da fermentação como proteases, amilases, antibióticos, surfactantes e químicos especiais com risco baixo de efeitos adversos na saúde humana e no meio ambiente (He, et al. 2006).

A produção de compostos antimicrobianos incluem predominantemente péptidos que podem ser sintetizados ribossomal ou não ribossomalmente (Caetano, et al. 2011).

As bacteriocinas de *B. licheniformis* são geralmente estáveis ao pH e resistentes a altas temperaturas, na ordem dos 100°C (Abriouel, et al. 2011).

A bacitracina foi o primeiro antibiótico peptídico de síntese não ribossomal derivado de culturas de *B. licheniformis* e tem sido amplamente aplicado nas áreas da medicina humana e veterinária, exibido atividade contra estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Abriouel, et al. 2011) (He, et al. 2006).

São conhecidas algumas bacteriocinas produzidas por *B. licheniformis* como a Bacilocina 490 entre outras como referido na Tabela 2.

Tabela 2: Bacteriocinas e BLIS produzidas por *Bacillus licheniformis* (Abriouel, et al. 2011).

Estirpe <i>Bacillus licheniformis</i> ou nome bacteriocina	Tipo de actividade	Bactérias alvo
Bacilocina 490	antimicrobiana	<i>B. smithii</i> , <i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> <i>G. strearothermophilus</i>
B. licheniformis P40	antimicrobiana	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> <i>Streptococcus sp</i>
B. licheniformis ZJU12	Antimicrobiana; antifúngica	Fungos e bactérias Gram positivas
B. licheniformis MKU	Antimicrobiana; antifúngicas, anti-leveduras	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Arpergillus</i> <i>fischeri</i> , <i>Penicilium funiculosum</i> . <i>Candida albicans</i>
Péptido A12-C	Antibacteriana; antifungica	<i>Microsporium canis</i> CECT 2797, <i>Mucor mecedo</i> CECT 2653, <i>Mucor plumbeus</i> CCM F 443, <i>Sporothrix schenckii</i> CECT 2799, <i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> CECT 2793 <i>B. megaterium</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Sarcina</i> e <i>Mycobacterium</i>

1.3. Síntese de bacteriocinas

O cluster de genes para a síntese de bacteriocinas é composto por genes estruturais e genes acessórios necessários para o transporte, imunidade, regulação, processamento e produção da forma madura da bacteriocina. A produção de bacteriocinas requer proteínas adicionais envolvidas na imunidade para autoproteção, processamento enzimático, transporte e sistemas reguladores composto com fatores de indução, sensores de kinases e reguladores de respostas (Lee e Kim 2011).

As bacteriocinas são inicialmente sintetizadas como péptidos prematuros com uma sequência sinal no N-terminal. O transporte das bacteriocinas é assegurado pelo sistema

de transporte do tipo ATPbinding cassette (ABC) que são requeridos para função dupla que inclui atividade proteolítica na N-terminal e translocação dos péptidos (nisina) ou apenas transporte das bacteriocinas (subtilina). (Lee e Kim 2011) Após serem modificadas e transportadas para fora das células produtoras, as bacteriocinas são enzimaticamente clivadas para remover a sequência sinal. Este passo promove a maturação e ativa a subtilina. A transcrição de proteínas acessórias é co-regulada com a produção de bacteriocinas por um sistema de sinal de transdução dependente de densidade celular.

Na subtilina o cluster de genes é composto por 10 genes *spaB**TCSIFEGRK* como ilustra a Figura 2 com um tamanho de aproximadamente de 12 kb, com 4 promotores envolvidos na transcrição (Lee e Kim 2011).

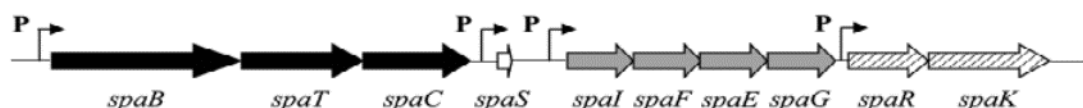


Figura 2: Organização genética do cluster do gene da subtilina. Cada letra maiúscula representa uma proteína envolvida na biossíntese da subtilina. B e C, precursor modificado; T, exportar; S, precursor estrutural da subtilina; I,F,E e G, Imunidade; R e K, sinal de transdução. As setas a negro representam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

O gene estrutural *spaS* dá origem a pré-subtilina, composta por 56 aminoácidos, que matura e dá origem a subtilina ativa contendo 32 aminoácidos.

Pensa-se que as proteínas codificadas pelos genes *spaB* e *spaC* estão envolvidas em modificações pós-transcrição (Figura 3) que ocorrem no citosol. Foi sugerido que SpaT é uma proteína transportadora do tipo ABC localizada na membrana para exportar a presubtilina e que forma um complexo com os produtos dos genes *spaB* e *spaC*. Este complexo converte a presubtilina em presubtilina modificada que contem aminoácidos invulgares e ligações dissulfeto (Lee e Kim 2011).

Depois de exportada a présubtilina modificada vai sofrer clivagem proteolítica pelas subtilisina serino protéase (AprE), WprA, e Vpr para formar subtilina matura. No cluster

de genes encontram-se quatro genes de um operação (Figura 3) que estão envolvidos na codificação de proteínas responsáveis pela 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. Este complexo é um transportador ABC responsável pela saída de subtilina da célula e atua também como componente imunitária. (Lee e 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 pequenos péptidos indutores em Gram-positivas. Algumas bacteriocinas podem também induzir a sua própria produção, por fosforilação e desfosforilação do sensor cinase (Lee e Kim 2011).

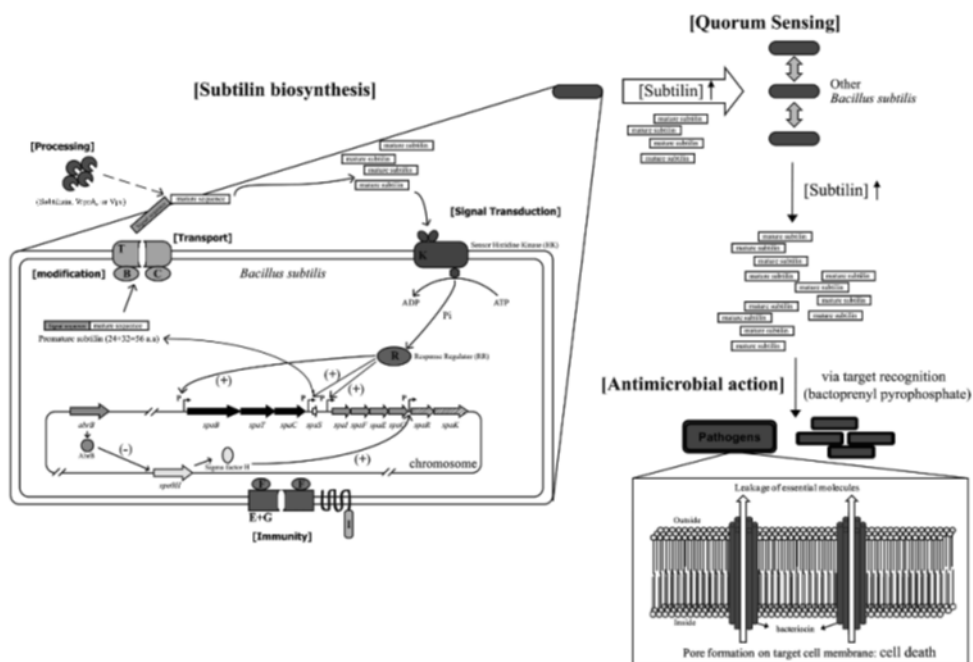


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese da subtilina. A subtilina madura induz a sua própria síntese. Esta é reconhecida pelo sensor cinase (SpaK) que consequentemente fosforila um regulador de resposta (SpaR). O SpaR fosforilado por sua vez vai regular três promotores que se encontram no cluster de genes da subtilina. O fator sigma H quando está sobre o controlo de AbrB regula positivamente o promotor. Os sinais de positivo e negativo significam regulação positiva ou regulação negativa 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 receptores específicos na superfície da célula alvo e forma poros que por sua vez causam a morte da célula (Lee e Kim 2011).

1.4. Aplicações

1.4.1. Aplicações na alimentação

Os aditivos artificiais utilizados na preservação dos alimentos produzem efeitos na saúde indesejados. Cada vez mais os consumidores exigem a substituição de ingredientes artificiais com grande potencial nocivo por compostos seguros e naturais. Como tal, tem vindo a crescer o interesse em expandir o uso de antimicrobianos naturais como timol, carvacrol e bacteriocinas como conservantes (Fuente-Salcido, et al. 2008).

Quando se considera a aplicação de bacteriocinas e péptidos na alimentação existem três critérios a ser respeitados: segurança, qualidade e nutrição/saúde. As bacteriocinas e péptidos têm o potencial de contemplar todos os aspetos destes três critérios, desde a qualidade microbiana, a perceção do sabor, a alergenicidade (Millis, et al. 2011).

De entre os vários bio conservantes, as bacteriocinas chamam a atenção por serem um composto de origem proteica de baixa massa molecular secretado por bactérias, reconhecidos como seguros (GRAS), sem causar efeitos adversos nos alimentos. Acredita-se que as bacteriocinas são seguras para consumo humano porque tornam-se inativas quando tratadas com enzimas digestivas no estômago (Sharma, Kapoor, et al. 2011).

Existem poucas bacteriocinas disponíveis no mercado (Salum, Lee e Kim 2012). A nisina, produzida por algumas estirpes de *Lactococcus lactis* e vendida como Nisaplin já tem o estatuto de conservante alimentar pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América e pela Organização Mundial de Saúde, sendo utilizada comercialmente em indústrias alimentares por quarenta países desde 1983. Juntamente com a pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici* e vendida como ALTA 2431 são as únicas disponíveis no mercado. A nisina está disponível comercialmente em forma de pó seco concentrado e a pediocina como pó fermentado contendo bacteriocinas (Martirani, et al. 2002) (Millis, et al. 2011) (Sharma e Gautam 2008) (Salum, et al. 2012).

As utilizações da nisina como conservante 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 os alimentos de contaminações bacterianas,

sendo comum utilizar-se uma combinação de bacteriocinas e de outros agentes conservantes (Abriouel, et al. 2011) (Martirani, et al. 2002); (Millis, et al. 2011).

Existe uma grande quantidade de bacteriocinas produzidas por *Bacillus sp.* mas o seu valor industrial e importância tem sido subestimados e apenas uma pequena quantidade de bacteriocinas são usadas na indústria alimentar. Algumas espécies como *B. subtilis* e *B. licheniformis* são reconhecidas como seguras GRAS, enquanto outras espécies são altamente patogênicas ou produzem toxinas capazes de contaminar os alimentos como é o caso do *B. anthracis* (Abriouel, et al. 2011).

1.4.2. Aplicações na saúde animal

O uso de antibióticos como meio de terapia e de agentes profiláticos como promotores de crescimentos na agropecuária tem levado a um aumento da resistência a antibióticos e ao aparecimento de estirpes de bactérias multirresistentes. O uso de agentes competitivos de exclusão e de probióticos na alimentação do gado tem chamado a atenção como sendo uma medida eficaz e econômica no controle de doenças nos animais e no melhoramento do desempenho da reprodução (Barbosa, et al. 2005).

O género *Bacillus* tem sido usado como probiótico na saúde humana e animal, embora seja necessário um processo de seleção rigoroso para os candidatos a probióticos. Existem evidências que sugerem que os esporos de *Bacillus sp.* germinam no trato gastro intestinal, embora não se saiba que formas, células ou esporos ou ambas, sejam responsáveis pelo efeito probiótico e exclusão competitiva. A administração de *Bacillus sp.* como probióticos traz vantagens como baixo custo de produção, fácil preparação, resistência ao processo de preparação e o facto de terem um tempo de vida útil elevado quando exposto a diferentes temperaturas (Abriouel, et al. 2011) (Barbosa, et al. 2005).

As bacteriocinas são usadas na saúde animal como agentes de prevenção de doenças causadas por diferentes microrganismos patogênicos incluindo bactérias zoonóticas. Por exemplo, a lichenina produzida pelo *Bacillus licheniformis* foi descrita como tendo atividade antibacteriana contra *Streptococcus bovis* e *Eubacterium ruminantium* (Abriouel, et al. 2011) (Barbosa, et al. 2005). A nisina tem sido utilizada no tratamento de mastites em bovinos como tratamento intra-mamário, não afetando a qualidade do leite e carne (Garg, et al. 2012).

1.4.3. Aplicações ambientais

Os *Bacillus sp.* estão naturalmente associados ao solo e plantas. Assim sendo, as estirpes produtoras de bacteriocinas ou BLIS podem ser utilizadas na aplicação de agentes de biocontrolo. Muitas destas bacteriocinas podem inibir bactérias patogénicas de plantas, podendo ser aplicadas como controlo biológico de doenças de plantas. Por exemplo, a ericina S é ativa contra *Clavibacter michiganensis*, agente causador da necrose do tomate, podendo ser desenvolvida como bioprotector do tomate (Abriouel, et al. 2011).

A Bac 14B é produzida pelo *B.subtilis* 14B isolado das raízes de plantas. É ativa contra *Agrobacterium tumefaciens* podendo ser um potencial agente de biocontrolo para reduzir as infeções causadas pela *A.tumefaciens* (Abriouel et al, 2011).

As bacteriocinas com atividade antifúngica podem ser utilizadas em frutas e legumes como biocontrolo após a colheita (Abriouel, et al. 2011).

1.4.4. Aplicações na saúde humana

Péptidos bioativos tem o potencial de regular algumas funções fisiológicas no organismo. Estes podem estar encriptados na cadeia de polipéptidos das proteínas e podem ser libertados via proteólise, onde podem interagir com os recetores apropriados, exibindo atividade semelhante a hormonas. Geralmente contém entre três a vinte aminoácidos, mas podem ser maiores em alguns casos. Várias bioatividades tem sido descritas, como péptidos que reduzem a pressão arterial (péptidos anti-hipertensivos), péptidos anti-trombóticos, péptidos opióides, fosfopéptidos de caseína, péptidos antimicrobianos, péptidos citomodulatórios e péptidos imunomodulatórios (Millis, et al. 2011).

Dentro do género *Bacillus* podemos encontrar uma grande variedade de bacteriocinas consideradas seguras (GRAS), embora apenas algumas estejam inteiramente conhecidas e caracterizadas pelo seu potencial como agentes antimicrobianos (Abriouel, et al. 2011).

A crescente resistência aos antibióticos convencionais tem resultado num interesse crescente na consideração das bacteriocinas como uma alternativa antimicrobiana para o tratamento de infeções humanas. A resistência cruzada a bacteriocinas e antibióticos é raramente vista porque estes dois grupos de antimicrobianos

atuam de modo--- diferente nos alvos celulares. A descoberta das bacteriocinas foi vista como uma nova medida para controlar bactérias patogénicas resistentes a antibióticos como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina) (Abriouel, et al. 2011) (Aunpad e Na-Bangchang 2007).

A subtilosina A é uma bacteriocina com um grande potencial de aplicação contra patogénios vaginais como *G. vaginalis* resistente às terapias convencionais com antibiótico.

Algumas bacteriocinas apresentam atividade antifúngica para além de atividade antimicrobiana, a qual pode ser explorada em aplicações clínicas (Abriouel, et al. 2011).

Também podem ser encontradas aplicações como probióticos para uso humano devido à sua ação inibitória contra patogénios intestinais como *C. perfringens* e *C. difficile* entre outros. *B. polyfermenticus* SCD é um probiótico comercial para o tratamento a longo prazo de desordens intestinais causadas por *C. perfringens*. O probiótico *B. clausii* produz substâncias inibitórias contra *S. aureus*, *E. faecium* e *C. difficile* e a turicina CD tem como alvo específico *C. difficile* (Abriouel, et al. 2011).

As bacteriocinas de *Bacillus sp.* podem também ter aplicações como contraceptivos naturais, como a subtilosina A que tem atividade espermicida contra espermatozoides humanos e de alguns animais (Abriouel, et al. 2011).

Cada vez mais são encontradas novas aplicações para as bacteriocinas, atualmente estão a ser aplicadas em nanomateriais. Estão a ser estudadas nanofibras, preparadas a partir de polímeros selecionados que podem ser utilizados como matriz de suporte para as bacteriocinas, protegendo-as e permitindo a libertação gradual das moléculas. (Heunis, et al. 2011) Um outro exemplo refere-se à incorporação de bacteriocinas em cimento ósseo, que permite a libertação progressiva e continuada da bacteriocina com o objetivo de reduzir a probabilidade de infeções pós-cirúrgicas (van Staden 2011).

Também estão a ser estudadas aplicações de bacteriocinas no tratamento de cancro, pois algumas mostram atividade contra células tumorais. Considerando que as bacteriocinas são naturais e legalmente adicionadas nos alimentos, estas podem ser vistas como uma potencial droga anti tumoral (Yang, et al. 2014).

As bacteriocinas são uma área de grande interesse de investigação. É estudada cada vez mais pelas suas aplicações de grande interesse em várias áreas sendo uma das principais a saúde humana contribuindo para o tratamento de várias doenças.

2. PERTINÊNCIA E OBJETIVOS DO TRABALHO

O género *Bacillus* tem sido alvo de estudos durante os últimos anos devido à grande variedade de espécies pertencentes a este género, à sua capacidade de resistência a condições extremas e às moléculas produzidas por estes microrganismos. Entre as moléculas de grande interesse produzidas por *Bacillus sp.* encontram-se as bacteriocinas, que podem ser exploradas para diversas aplicações relacionadas com a saúde humana e animal, ambiente e preservação de alimentos.

As bacteriocinas produzidas por *Bacillus sp.* estão a tornar-se cada vez mais importantes devido aos seus espectros de inibição, que podem incluir bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos para além de espécies de bactérias Gram-positivas, algumas das quais são conhecidas por serem patogénicas ao homem e animais.

A Coleção de Bactérias Esporulantes pertencente a Universidade dos Açores possui 2300 isolados, sendo que muitos destes evidenciaram atividade antimicrobiana no *screening* de bioatividades realizado incluindo atividade contra a estirpe de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA).

Cada vez mais a investigação concentra-se na pesquisa de novas substâncias que possam atuar contra agentes patogénicos resistentes, uma vez que o número de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos está a aumentar colocando novos desafios no tratamento de infeções.

Este trabalho é de grande relevância, pois pretende identificar bactérias do género *Bacillus* que produzam substâncias antimicrobianas que possam ter vastas aplicações incluindo atividade contra estirpes resistentes.

Os objetivos deste trabalho são:

- Seleção de 5 isolados da Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores para pesquisa de atividade antimicrobiana em cultura líquida.
- Otimização das condições de crescimento de 1 isolado do género *Bacillus* em cultura líquida.
- Maximização da produção de atividade antibacteriana em cultura líquida.
- Avaliação da natureza proteica da atividade antimicrobiana das moléculas ativas do sobrenadante.
- Purificação parcial e caracterização da bacteriocina produzida pelo isolado que apresenta maior atividade antimicrobiana

3. METODOLOGIA

3.1. Culturas bacterianas

Os isolados de *Bacillus sp.* (Tabela 3) provenientes da Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores foram recuperados a partir de esporos que se encontravam desidratados a 10°C em tiras de papel de filtro. Colocou-se uma tira de papel com esporos numa caixa de Petri com agar nutritivo a 30°C. A partir desta cultura isolaram-se colónias em placas de agar nutritivo que foram mantidas a 4°C e repicadas mensalmente.

Os isolados de *Bacillus sp.*, recolhidos em São Miguel, foram selecionados de acordo com a informação contida na base de dados da Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores (Tabela 3).

As estirpes das bactérias de referência listadas na Tabela 4 pertencem à coleção do laboratório de Microbiologia da Universidade dos Açores e estão mantidas em Agar Nutritivo a 4°C. A estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) pertence à coleção do laboratório do Hospital Divino Espírito Santo e foi identificada com o nome de isolado hospitalar 1 (IH1) e está mantida em Agar Nutritivo a 4°C.

Todos os organismos foram recuperados em meios de cultura e temperaturas adequadas como está indicado na Tabela 4.

Tabela 3: Características dos isolados de *Bacillus sp.* selecionados.

Isolados de <i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	Características
S14e	Atividade contra: <i>M. luteus</i> Produção de amilases, proteases extracelulares e lipases
S23e	Atividade contra: <i>M. luteus</i> Produção de proteases extracelulares
S26d	Atividade contra: <i>M. luteus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de proteases extracelulares
S53c	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> e <i>B. cereus</i> Produção de proteases extracelulares e lipases
S66a	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de amilases, proteases extracelulares e lipases
S74c	Atividade contra: <i>M. luteus</i> e <i>B. cereus</i> Produção de amilases, proteases extracelulares e lipases
S77e	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de amilases, proteases extracelulares e lipases
S114d	Atividade contra: <i>M. luteus</i> e <i>B. cereus</i> . Produção de proteases extracelulares
S117c	Atividade contra: <i>M. luteus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de proteases extracelulares
S118e	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de amilases, proteases extracelulares
S150c	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de amilases, proteases extracelulares e lipases
S156a	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de lipases
S160a	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. licheniformis</i> Produção de proteases extracelulares
S168e	Atividade contra: <i>M. luteus</i> e <i>B. cereus</i> Produção de amilases, proteases extracelulares
S172d	Atividade contra: <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> Produção de proteases extracelulares

Tabela 4: Estirpes de bactérias de referência e condições de cultura.

Organismo indicador*	Meio de cultura	Temperatura de incubação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Caldo nutritivo	30°C
<i>Escherichia coli</i> DSM 498	Caldo nutritivo	37°C
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030	Caldo nutritivo	30°C
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	Caldo nutritivo	30°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Caldo nutritivo	37°C
IH1 – MRSA	Caldo nutritivo	37°C

*DSM – Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Culture; ATCC – American Type Culture Collection

3.2. Meios de cultura

Utilizaram-se os seguintes meios de cultura líquidos para o crescimento dos microrganismos: Caldo Nutritivo - CN (Merck); Brain Heart Infusion – BHI (Difco); Água Peptonada – AP constituída por 10g/L Peptona Bacteriológica (Diagnostic Liofilchem), 5g/L de Cloreto de Sódio (Scharlau), 3,5g/L de Fosfato de Sódio dibásico (Sigma-Aldrich) e 1,5g/L de Fosfato de Potássio monobásico (FLuka Analytical); meio de cultura de Peptona enriquecido com Sorbitol (PS) constituído por: 5g/L de Peptona Bacteriológica, 2,5g/L de Extrato de Levedura (Biokar Diagnosis), 2,5g/L de Cloreto de Sódio, 0,01g/L de Sulfato de Magnésio anidro (Sigma-Aldrich), 8g/L de Nitrato de Potássio (Sigma-Aldrich), 0,20g/L de Fosfato de Potássio (Sigma-Aldrich) e 25g/L de D-Sorbitol (Sigma Aldrich)

Os meios de cultura sólidos utilizados foram: Agar Nutritivo (Diagnostic Liofilchem) e Soft Nutrient Agar – SNA composto por 7g Agar Bacteriológico (Merck) e 8g de Caldo Nutritivo (Merck).

3.3. Otimização das condições de crescimento dos isolados de *Bacillus sp.*

Seguiu-se o crescimento dos isolados S66a, S74c, S114d, S118e e S172d no meio de cultura líquido BHI a 30°C.

Prepararam-se os pré-inóculos dos isolados de *Bacillus sp.* em 5mL de meio de cultura BHI. Os pré-inóculos foram incubados a 30°C por 12h a 200rpm. Colocou-se 1mL da pré-cultura num *erlenmeyer* contendo 50mL de meio de cultura BHI. Mantiveram-se as condições de crescimento 30°C, 200rpm durante 36h.

Durante este período de crescimento de 36h recolheu-se 1mL de cultura a cada intervalo de 3 horas (nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 e 36) para medição da densidade ótica (D.O.) a 600nm no nano-espectrofotómetro (Implen). Também foi recolhido 1mL de cultura para testar a atividade antimicrobiana do sobrenadante. Foram realizadas 3 repetições de cada ensaio.

Otimizaram-se as condições de crescimentos do isolado S114d. Para tal foi utilizado o mesmo procedimento acima descrito, testando os meios de cultura BHI, AP, PS e CN para as diferentes temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C.

3.4. Atividade antimicrobiana dos isolados de *Bacillus sp.*

Após a análise das características bacteriológicas das bactérias pertencentes à Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores foram escolhidos 15 isolados para o teste de co inoculação para deteção de atividade antimicrobiana.

Foram utilizados os isolados S14e, S23c, S26d, S53c, S66a, S7sara4c, S77e, S114, S117c, S118e, S150c, S156a, S160a, S168e e S172d.

Utilizou-se uma variação do método descrito por Walker, et al 1998.

Numa caixa de Petri com Agar Nutritivo inoculou-se o isolado de *Bacillus sp.* na vertical (Figura 4-A). A caixa foi a incubar a 28°C durante 24 horas.

Após o período de incubação fez-se a co-inoculação das bactérias alvo (Figura 4-A): *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. aureus* e MRSA. A co-inoculação das bactérias alvo foi feita perpendicularmente à bactéria produtora (Figura 4-B). As caixas foram a incubar a 28°C durante 24 horas.

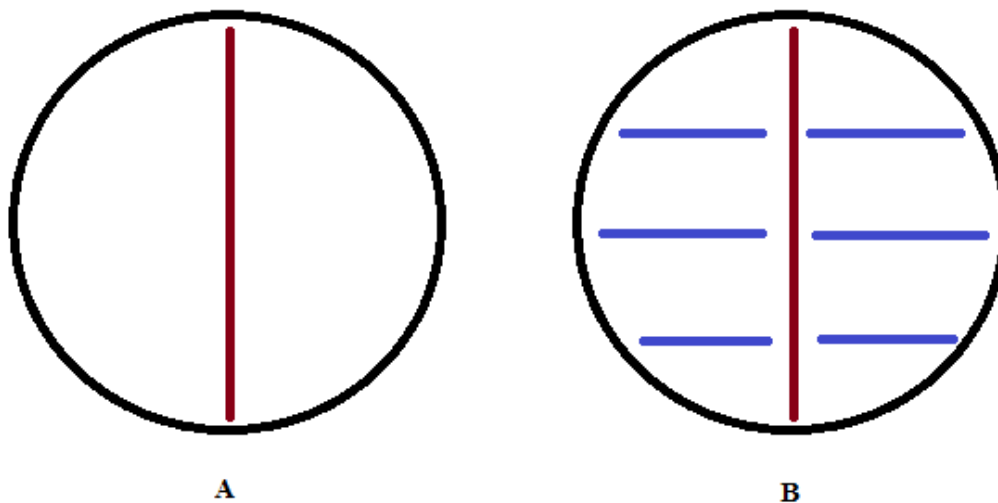


Figura 4: A- inoculação da bactéria produtora na vertical na caixa de Petri; B – inoculação das bactérias alvo perpendicularmente à bactéria produtora na caixa de Petri

3.5. Preparação dos sobrenadantes das culturas bacterianas

As culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados em membranas de 0,20 μm de acetato de celulose (Sartorius Stedin Minisart RC15). Os sobrenadantes filtrados foram guardados em recipientes (*eppendorfs*) esterilizados a -20°C para posterior utilização.

3.6. Teste de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos sobrenadantes filtrados, das frações concentradas e das frações obtidas durante o processo de purificação foi detetada através do teste de difusão em agar (Agar Well Difusion Assay – AWDA) (Tagg e McGiven 1971).

Adicionou-se 100 μL de uma diluição em soro fisiológico de 1:100 da cultura de *M. luteus* com 40 horas de crescimento a 30°C e 200 rpm a 25mL de SNA. Homogeneizou-se e colocou-se numa caixa de Petri. Depois de o SNA solidificar fizeram-se poços, com o diâmetro aproximado de 7mm, utilizando-se a parte posterior de uma pipeta de Pasteur esterilizada. Selou-se a base de cada poço com 5 μL de SNA.

Em cada poço foi aplicada uma alíquota de 100µL de amostra filtrada. As placas de Petri foram de seguida a incubar a 4°C durante 3 horas de forma a permitir a difusão da amostra pelo meio solido. Por fim as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da medição dos halos de inibição em milímetros (mm).

3.7. Concentração e fracionamento

Recolheu-se o sobrenadante de 200mL de cultura (distribuído por 4 *erlenmeyers* com 50mL de cultura cada) de S114d em BHI com 18horas de crescimento a 30°C e 200 rpm. Centrifugou-se o sobrenadante a 5000 x g a 4°C durante 20 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se através de sistema de filtração a vácuo (Micro Filtration Systems) com membranas de acetato de celulose de 0,2µm (GVS Filter Technology).

Procedeu-se à concentração e fracionamento através da utilização de sistemas de ultrafiltração *Centricon* (Millipore) com membranas de cut-off de 30kDa, 10kDa e 3kDa.

A fração com *cut-off* superior a 30kDa foi obtida após 40 minutos de centrifugação a 5000 x g, 4°C. A fração com *cut-off* inferior a 30kDa foi colocada num novo *Centricon* com uma membrana de *cut-off* de 10kDa e centrifugada durante 40 minutos a 5000 x g, 4°C. A fração com *cut-off* inferior a 10kDa foi novamente colocada num *Centricon* com uma membrana de 3kDa e centrifugada 40 minutos, 5000 x g, 4°C.

No final do processo obtiveram-se quatro frações: com tamanho superior a 30kDa (>30kDa), com tamanho compreendido entre 10kDa e 30kDa (10-30kDa), com tamanho compreendido entre 3kDa e 10kDa (3-10kDa) e com tamanho inferior a 3kDa (<3kDa). As frações foram lavadas com tampão Tris-HCl 50mM pH8.8 e armazenadas a -20°C.

Foi realizado o teste de difusão em agar (AWDA) contra a bactéria *M. luteus* para as quatro frações obtidas e após esterilização em membrana de acetato de celulose..

3.8. Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas

Para estudar a estabilidade térmica das amostras utilizaram-se alíquotas de 100µL de sobrenadante filtrado livre de células do isolado S114d e das frações concentradas

(>30kDa, 10-30kDa, 3-10kDa e <3kDa) do mesmo isolado. As alíquotas foram expostas às temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C por 30 minutos (Eppendorf – Thermostast Plus) e a 121°C por 20 minutos (ciclo de esterilização em autoclave).

Utilizaram-se como controlos positivos o sobrenadante livre de células e as frações de sobrenadante concentradas, sem qualquer tipo de tratamento térmico.

Após o tratamento térmico, as amostras e os controlos foram testados através do teste de difusão em agar (AWDA) contra a bactéria *M. luteus*.

Para testar a sensibilidade a enzimas hidrolíticas foram utilizadas duas enzimas; tripsina e proteinase K.

Preparou-se 1mL de solução stock de cada enzima, com concentração final de 20mg/mL para a tripsina e 40mg/mL para a proteinase K e esterilizou-se através de filtração em membrana de acetato de celulose de 0,20µm (Sartorius Stedin Minisart RC15)

Prepararam-se alíquotas do sobrenadante livre de células do isolado S114d e das frações concentradas (>30kDa, 10-30kDa, 3-10kDa e <3kDa).

A alíquotas de 70µL das amostras a testar adicionaram-se 30µL de tripsina numa concentração final de 6mg/mL.

A alíquotas de 80µL das amostras a testar adicionaram-se 20µL de proteinase K numa concentração final de 8mg/mL.

Preparam-se os controlos para o teste enzimático. Controlo 1: amostras a testar + tampão (fosfato de sódio 50mM pH 7,4); controlo 2: enzimas + tampão (fosfato de sódio 50mM pH 7,4).

As amostras e controlos foram incubados nas mesmas condições, a 37°C durante 5 horas. Após a incubação as enzimas foram inativadas a 90°C por 5 minutos num termobloco (Eppendorf – Thermostast Plus). Os controlos sofreram o mesmo tratamento térmico relativo a inativação das enzimas.

Por fim, as amostras e controlos foram testados para determinar a atividade antibacteriana em teste de difusão em agar (AWDA) contra a bactéria *M. luteus*.

3.9. Indução da atividade antimicrobiana de S114d

Testou-se a o efeito de outras bactérias na indução da atividade microbiana utilizando uma metodologia semelhante à seguida por Martínez-Cardeñas, et al. 2011. Fez-se uma pré-cultura de *B. licheniformis* em 5 mL de meio BHI que foi incubada *overnight* a 30°C e 200 rpm.

Transferiu-se 1mL da pré-cultura para um *erlenmeyer* com 50 mL de meio BHI e mantiveram-se as condições de crescimento por 6 horas.

Retiraram-se 4 mL de cultura que foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se numa membrana de 0,20µm (Sartorius Stedin Minisart RC15).

O *pellet* foi reutilizado, adicionando-se 1mL de soro fisiológico esterilizado. Agitou-se esta suspensão no *vórtex* e centrifugou-se a 10.000 rpm durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante o adicionou-se 200µL de soro fisiológico. Agitou-se novamente e colou-se num banho a 65°C por 20 minutos.

Adicionou-se 2 mL de sobrenadante da cultura de *B. licheniformis* filtrada e livre de células a uma cultura do isolado S114d num *erlenmeyer* com 50mL de meio BHI com 6 horas de crescimento a 30°C e 200 rpm.

Foram também adicionados 400µL do *B. licheniformis* inativado pelo calor a outra cultura do isolado S114d num *erlenmeyer* com 50mL de meio BHI com 6 horas de crescimento a 30°C e 200 rpm.

Utilizou-se como controlo positivo uma cultura do isolado S114d num *erlenmeyer* com 50mL de meio BHI com 6 horas de crescimento a 30°C e 200 rpm sem adição de indutores.

As culturas cresceram por mais 12 horas a 30°C e 200 rpm.

Testou-se a atividade antimicrobiana das culturas com o teste de difusão em agar (AWDA) contra as bactéria *M. luteus*, e *B. licheniformis*.

Este procedimento também foi realizado com a bactéria *S. aureus* como indutor, e testou-se a atividade antimicrobiana em teste de difusão em agar contra *M. luteus*, e *S. aureus*.

3.10. Extração de DNA

Extraíu-se o DNA dos isolados S14e, S23c, S26d, S53c, S66a, S74c, S77e, S114, S117c, S118e, S124a, S150c, S156a, S160a, S168e e S172d.

O DNA dos isolados de *Bacillus sp.* foi isolado a partir de uma cultura líquida em fase exponencial incubada a 30°C em 5mL de Caldo Nutritivo durante 16 horas a 200 rpm.

Centrifugou-se 1mL de cada cultura a 13.000 rpm durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* em 500µL de água destilada esterilizada. Agitou-se no *vórtex* e centrifugou-se novamente a 13.000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100µL de água destilada esterilizada e agitou-se no *vórtex*.

De seguida procedeu-se a lise das células através de choque térmico. As células foram colocadas a -80°C durante 15 minutos e de seguida foram aquecidas a 95°C por 15 minutos.

Foram, por fim, centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto e colocadas a -20°C para posterior utilização.

3.11. Condições e amplificação de um fragmento do gene 16S

A amplificação de um fragmento do gene 16S foi realizada através da utilização de *primers* específicos para o género *Bacillus* e para géneros filogeneticamente próximos B-K1/F, 5'-TCACCAAGGCRACGATGCG3' e B-K1/R, 5'-CGTATTCACCGCGGCATG-3' (Wu et al. 2006).

A reação de amplificação decorreu num termociclador da Applied Biosystem (veriti 96 well Thermalcycler) com um volume de reação de 25µL.

Cada mistura de reação continha 2µL de DNA, 19,4µL de água Mili-Q, 2,5µL de solução tampão (Sigma Aldrich), 0,5 µL de dNTP's, 0,25µL de cada *primer* (B-K1/F e B-K1/R) e 0,1µL de Taq Polimerase (Dream Taq).

O programa de amplificação utilizado (PCR) foi composto por um passo inicial de desnaturação por 3 minutos a 94°C, seguindo-se 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 (Wu, et al. 2006).

Foram incluídos dois controlos na reação: água Mili-Q como controlo negativo e DNA do isolado S53c como controlo positivo.

3.12. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram separados numa eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 1,5% em 0,5 x TBE (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH8,0) contendo 1µL/mL de Brometo de Etídio (0,5 µg/ml).

Às alíquotas de 5µL dos produtos de PCR adicionou-se 1µL de tampão de corrida Azul de Bromofenol. A migração deu-se durante 40 minutos a 100V.

No final da corrida retirou-se cuidadosamente o gel e visualizaram-se as bandas no aparelho de luz UV (Gel Doc, Bio-Rad) e fotografou-se o gel.

Estimou-se o tamanho dos fragmentos de DNA através do marcador de 100bp (Sigma-Aldrich) (Wu, et al. 2006).

3.13. Digestão enzimática e identificação dos perfis ARDRA

Os produtos de PCR foram submetidos a digestão enzimática pela enzima AluI (Fermentas) (Wu et al. 2006).

A 8,5µL de produto de PCR adicionou-se 1µL de tampão de enzima (Fermentas) e 0,5µL de enzima AluI. Os tubos contendo a mistura incubaram *over-night* a 37°C.

Após o período de incubação foram adicionados 2µL de tampão de corrida Azul de Bromofenol (Sigma-Aldrich) a cada amostra e realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 2,5% em 0,5 x TBE (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH8,0) contendo 1µL/mL de Brometo de Etídio. A migração deu-se a 100V durante 50 minutos.

Foi utilizado um controlo positivo com DNA amplificado do isolado de *Bacillus sp.* S53c assim como um controlo negativo com água destilada.

No final da corrida eletroforética retirou-se cuidadosamente o gel e observaram-se as bandas no aparelho de luz UV (Gel Doc, Bio-Rad). fotografou-se o gel e procedeu-se à identificação dos perfis de restrição ARDRA (Wu et al. 2006).

Os fragmentos de DNA foram estimados através de um marcador de peso molecular de 100bp (Sigma-Aldrich).

3.14. Purificação do produto de PCR

Utilizou-se um *kit* de purificação (PureLink PCR Purification Kit - Invitrogen) para purificar o produto de PCR. Procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante.

Depois da purificação do DNA, procedeu-se à sua quantificação num espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) e armazenou-se a -20°C para posterior sequenciação.

3.15. Sequenciação do DNA e análise

A amostra contendo o fragmento do gene 16s do isolado S114d foi enviada para o laboratório STABVida para sequenciação. Foram realizadas duas reações de sequenciação utilizando os *primers* B-K1/F e B-K17R.

A sequência consenso foi obtida pelo alinhamento das duas sequências obtidas, utilizando o programa *Bioedit*.

Recorreu-se ao programa BLASTN do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para estudar a homologia para a sequência consenso do fragmento do gene 16S.

3.16. Purificação parcial S114d

A fração de sobrenadante livre de células e concentrada 150 vezes em *Centricon* com *cut-off* de 10kDa com tamanho superior a 10kDa foi submetida a uma cromatografia de troca iónica Hitrap Cato Q. Foi aplicada uma amostra com 900µL na coluna previamente equilibrada com tampão Tris-HCl pH 8, 50mM. A amostra foi eluída com o

tampão Tris-HCl pH 8, 50mM. NaCl 1M com um gradiente em steps de 15, 30, 60 e 100%, e um *flow rate* de 0,5ml por minuto e recolhida em frações de 2 ml.

As frações foram recolhidas, dialisadas em tampão Tris-HCl pH8,8, 50mM e concentradas em sistema de ultrafiltração *Centricon* com *cut-off* de 10kDa, filtradas em membrana de 0,2 µm (Sartorius Stedin Minisart RC15) e testadas em difusão em agar contra a bactéria *M. luteus*.

A fração da cromatografia de troca iônica que apresentou atividade antimicrobiana foi submetida a uma cromatografia de troca iônica Hitrap Q. Foi aplicada uma amostra com 500µL na coluna previamente equilibrada com tampão Tris-HCl pH 8, 50mM. A amostra foi eluída com o tampão Tris-HCl pH 8, 50mM. NaCl 1M com um gradiente linear de 0% a 50% com um incremento de 3% e passando depois para 100% e um *flow rate* de 0,5ml por minuto e recolhida em frações de 2 ml.

As frações foram recolhidas, dialisadas em tampão Tris-HCl pH8,8, 50mM e concentradas em sistemas de ultrafiltração *Centricon* com *cut-off* de 3kDa, filtradas em membrana de 0,2 µm (Sartorius Stedin Minisart RC15) e testadas em difusão em agar contra a bactéria *M. luteus*.

A fração da cromatografia de troca iônica que apresentou atividade antimicrobiana foi submetida a uma cromatografia analítica de exclusão molecular Gel Filtration em coluna Supedex 75 previamente equilibrada com tampão 20 mM de Tris-HCl pH 8, 0,15mM de NaCl. Foram aplicados 400µL. A proteína foi eluída com o tampão de equilíbrio a um *flow rate* de 0,40ml por minuto e recolhida em frações de 2 ml.

As frações foram recolhidas, dialisadas em tampão Tris-HCl pH8,8, 50mM e concentradas em sistemas de ultrafiltração *Centricon* com *cut-off* de 3kDa, filtradas em membrana de 0,2 µm (Sartorius Stedin Minisart RC15) e testadas em difusão em agar contra a bactéria *M. luteus*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção dos isolados de *Bacillus sp.*

A Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores é constituída por 2300 isolados de estirpes de *Bacillus sp.*. Após a análise detalhada de um *screening* anteriormente realizado a esta coleção, selecionaram-se 15 isolados com resultados positivos de atividade antimicrobiana contra outras bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), através do teste de co-inoculação.

4.2. Caracterização genética dos isolados de *Bacillus sp.* por ARDRA

Através da amplificação de um fragmento do gene 16S com cerca de 1114bp, com *primers* direcionados para o género *Bacillus* e para géneros filogeneticamente próximos, foi possível incluir os isolados em várias espécies do género *Bacillus*, de acordo com os perfis de restrição ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis), utilizando a enzima AluI, publicados por Wu, et al. 2006.

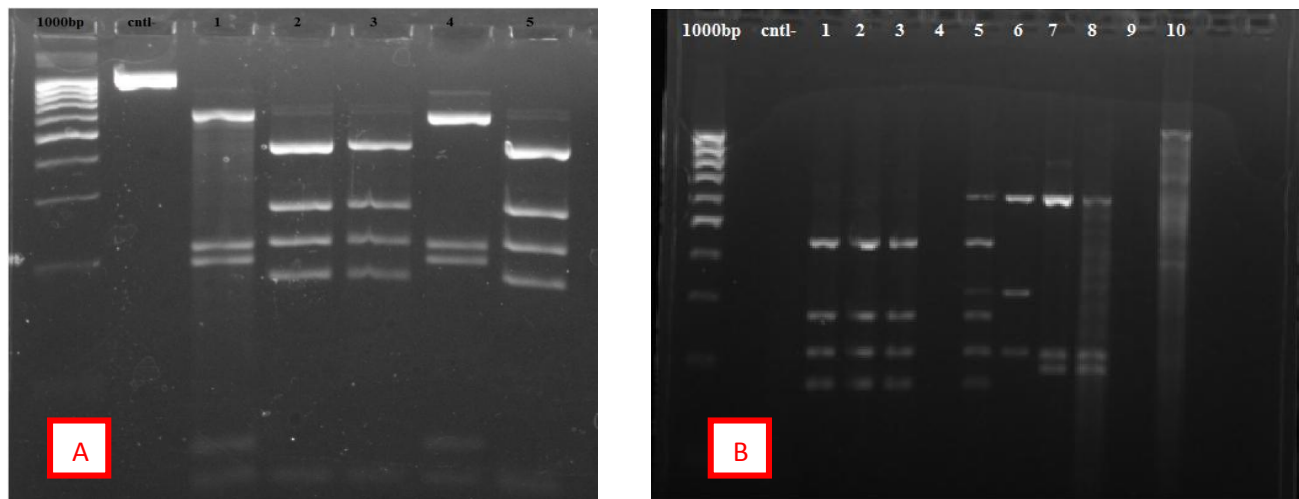


Figura 5: A- Perfil ARDRA, resultante da digestão por AluI de um fragmento de 1114 bp, em gel de agarose a 2%. Marcador 100bp; fragmento não digerido; 1 –S66a; 2 – S150c; 3 – S53c; 4S77e; 5 . S172d. B- Marcador 1000bp; fragmento não digerido; 1 – S14e; 2 – S74c; 3 – S118e; 4 – S160a; 5 – S156a; 6 – 168e; 7 – S26d; 8 – S117c; 9 – S23e; 10 – S114d.

Tabela 5: Identificação dos grupos filogenéticos dos isolados através dos perfis de restrição ARDRA (Wu et al. 2006).

Isolados de <i>Bacillus</i>	Grupo
S14e	Grupo <i>Bacillus mycooides</i>
S23e	Sem perfil de restrição
S26d	Sem perfil de restrição
S53c	Grupo <i>Bacillus subtilis</i>
S66a	Grupo <i>Bacillus mycooides</i>
S74c	Grupo <i>Bacillus mycooides</i>
S77e	Grupo <i>Bacillus mycooides</i>
S114d	Grupo <i>Bacillus licheniformis</i>
S117c	Sem perfil de restrição
S118e	Grupo <i>Bacillus subtilis</i>
S150c	Grupo <i>Bacillus subtilis</i>
S156a	Sem perfil de restrição
S160a	Grupo <i>Bacillus subtilis</i>
S168e	Sem perfil de restrição
S172d	Grupo <i>Bacillus subtilis</i>

De entre os 15 isolados selecionados inicialmente foram escolhidos 5 isolados (S66a, S74c, S114d, S118e e S172d) pertencentes a diferentes grupos para realizar o estudo das condições de crescimento ótimas para a produção de atividade antibacteriana em cultura líquida.

4.3. Atividade antimicrobiana dos isolados de *Bacillus sp.*

A avaliação do espectro de atividade antimicrobiana foi realizado para os 15 isolados de *Bacillus sp.* selecionados, através do método de co-inoculação. (Tabela 6)

Alguns isolados tiveram a capacidade de inibir o crescimento de *M. luteus*, *B. licheniformis*, *S. aureus* e MRSA.

As bactérias Gram-negativas testadas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) não foram inibidas pelos isolados testados.

A maior zona de inibição foi obtida contra *M. luteus* pelo isolado S160a.

Nos isolados S53c, S66a, S77e, S118e, S150c, S160a e S172d observou-se atividade contra *S. aureus* e MRSA. A atividade contra estas bactérias foi descrita por alguns autores para bacteriocinas produzidas por *Bacillus sp.* como a laterosporulina produzida por *Brevibacillus*, o péptido A89 produzido por uma estirpe de *B. licheniformis* e a subtilomicina produzida por uma estirpe de *Bacillus subtilis* (Mendo, et al. 2004) (Singh, et al. 2012) (Barbosa, et al. 2005) (Aunpad e Na-Bangchang 2007). Segundo os estudos realizados, as substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis de terem atividade contra outras bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas. A pumicilina 4 é ativa apenas contra bactérias Gram-positivas, e possui elevada atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas resistentes a antibióticos incluindo MRSA e VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina). A ação bactericida de algumas moléculas antimicrobianas é vista como uma consequência da desestabilização da membrana e/ou indução de autólise (Aunpad e Na-Bangchang 2007).

Alguns isolados não apresentaram a atividade antimicrobiana observada no *screening* inicial que permitiu a caracterização da coleção. Este facto pode dever-se a perda de atividade durante o armazenamento dos isolados, a uma má avaliação dos resultados durante o *screening* realizado à Coleção de Bactérias Esporulantes ou a uma possível contaminação dos isolados.

De todos os isolados testados 5 foram escolhidos tendo em conta a sua atividade antimicrobiana (Tabela 6) e o grupo filogenético de *Bacillus* (Tabela5) a que pertenciam de forma a haver maior diversidade genética.

Tabela 6: Atividade inibitória dos isolados de *Bacillus sp.* sobre as bactérias alvo: *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. aureus* e MRSA. (-) sem atividade antimicrobiana; (+) atividade antimicrobiana entre 0mm e 5mm; (++) atividade antimicrobiana entre 5mm e 10mm; (+++) atividade antimicrobiana superior a 10mm.

Isolado	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
S14e	-	++	-	-	-	-
S23e	-	-	+	-	-	-
S26d	-	+	-	-	-	-
S53c	-	++	-	-	++	++
S66a	-	++	+	+	+	+
S74c	-	++	+	-	-	-
S77e	-	++	+	-	+	+
S114d	-	++	-	-	-	-
S117c	-	++	-	-	-	-
S118e	-	++	+	-	+	++
S150c	-	++	+	-	+	++
S156a	-	-	-	-	-	-
S160a	-	+++	+	-	+	++
S168e	-	++	+	-	-	-
S172d	-	++	-	-	+	++

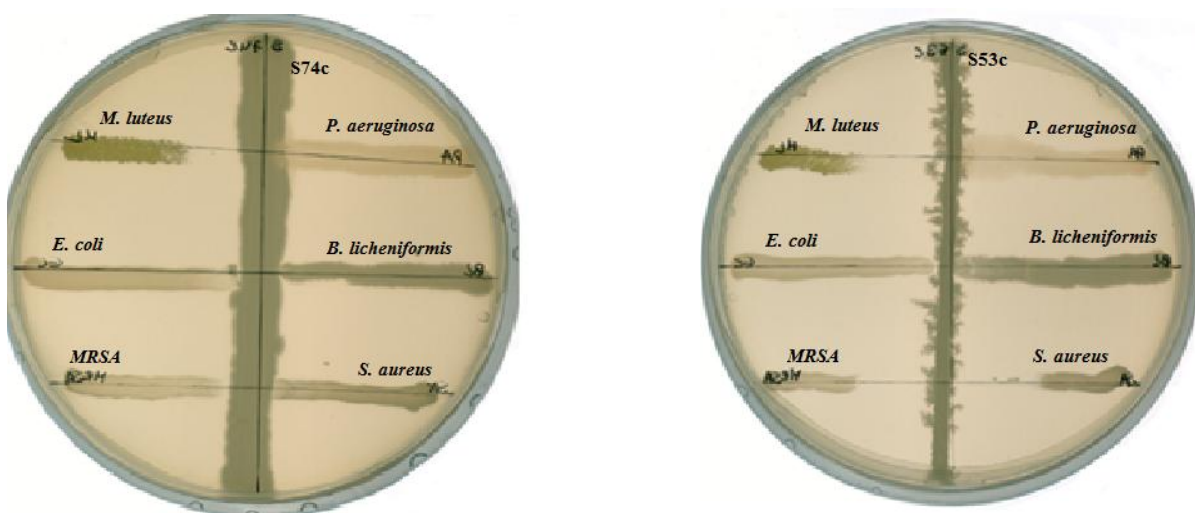


Figura 6: A - atividade inibitória do isolado S53c sobre *M. luteus*, *S. aureus* e MRSA; B- atividade do isolado S74c sobre *M. luteus*, pelo método da co-inoculação.

4.4. Estudo das condições de crescimento em meio líquido

Para se proceder à caracterização da produção de atividade antimicrobiana Foi necessário procurar a atividade em meio líquido em culturas dos isolados selecionados. Foram preparadas culturas em meio líquido BHI dos isolados S66a, S74c, S114d, S118e e S172d que cresceram a uma temperatura de 30°C com 200rpm. Foram feitas 3 repetições de cada ensaio e os resultados representam a média das 3. Seguiu-se o crescimento dos isolados e testou-se a atividade do sobrenadante em intervalos de 3 horas. Realizou-se o teste de difusão em agar para o sobrenadante recolhido em vários estádios do crescimento bacteriano e observou-se que apenas o isolado S114d apresentava atividade inibitória contra *M.luteus* em meio líquido, após 18 horas de incubação.

A partir deste resultado realizaram-se ensaios para o isolado S114d com diferentes composições do meio de cultura e diferentes temperaturas de incubação, permitindo maximizar a produção de substâncias com atividade antimicrobiana em meio líquido.

Nas culturas incubadas a temperatura de 25°C obtiveram-se valores mais elevados de densidade ótica (D.O.). nos meios BHI e CN (com valores de 3, 91 e 6,69 respetivamente), indicando um maior crescimento bacteriano. Os meios AP e PS tiveram menores valores de D.O., sendo que o meio PS foi o que registou um menor crescimento bacteriano (1,57) (Figura 7).

Para as temperaturas de incubação de 30°C e 35°C os resultados foram semelhantes. Os meios AP e PS apresentaram valores de D.O. mais baixos (1,14 e 1,44 a T 30°C e 1,4 e 1,7 para T 35°C, respetivamente). As culturas em meio BHI e CN apresentaram um maior crescimento com valores de DO de 4,04 e 12,75 a T30°C e 6,42 e 5,01 a T35°C, respetivamente) (Figuras 8 e 9).

As diferenças de crescimento bacteriano podem ser explicadas pela diferente composição dos meios. Os meios BHI e CN são meios mais ricos em sais, proteína e açúcares. Embora o meio BHI seja um meio extremamente rico em nutrientes nem sempre foi aquele em que se verificou um maior crescimento bacteriano, mas sim no meio CN (Figuras 7, 8 e 9).

Os meios AP e PS são meios mais pobres em nutrientes e ricos em peptona, a escassez em nutrientes leva a um crescimento bacteriano mais reduzido.

Testou-se a atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus* no fim da fase exponencial e principio da fase estacionária do crescimento com intervalos de 3 horas. Observou-se que a atividade antimicrobiana é maior (12mm) às 18 horas de incubação (inicio da fase estacionária) no meio BHI a 30°C (Tabela 7).

À temperatura de 25°C apenas se observa atividade antimicrobiana para o meio BHI às 15h, 18h, 21h e 24. A temperatura de 30°C também regista atividade para o meio CN às 15h. À temperatura de 35°C observa-se atividade antimicrobiana para o meio BHI às 15h, 18h, 21h e 24 h e para o meio CN às 24h (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade antimicrobiana do sobrenadante do isolado S114d a temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C, para os meios BHI, CN, AP e PS (atividade inibitória sobre *M. luteus* em mm).

Temperatura	T 25°C				T 30°C				T 35°C			
	Meio cultura e tempo	BHI	CN	AP	PS	BHI	CN	AP	PS	BHI	CN	AP
15h	7	0	0	0	0	8	0	0	8	0	0	0
18h	10	0	0	0	12	0	0	0	9	0	0	0
21h	11	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0
24h	11	0	0	0	0	0	0	0	9	8	0	0

Com base nos resultados obtidos verifica-se que as condições ótimas de produção de atividade antimicrobiana para o isolado S114d são: 18horas de incubação, 30°C, 200 rpm no meio BHI.

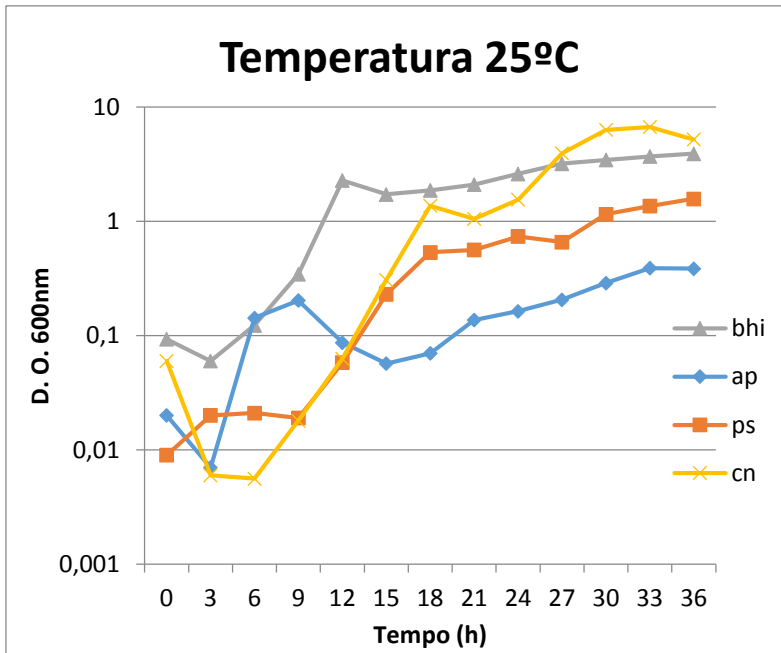


Figura 7: Curvas de crescimento do isolado S114d a 25°C para os meios de cultura BHI, CN, AP e PS.

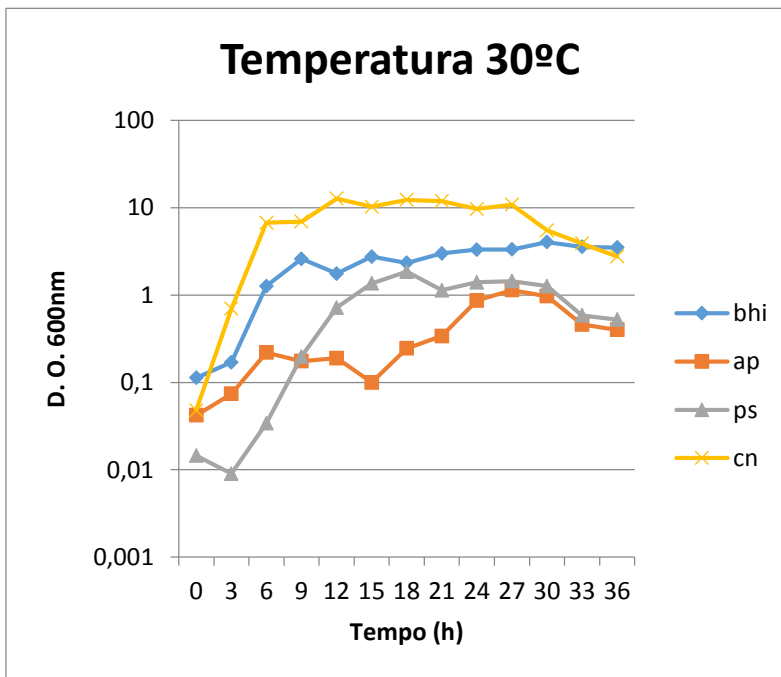


Figura 8: Curvas de crescimento do isolado S114d a 30°C para os meios de cultura BHI, CN, AP e PS.

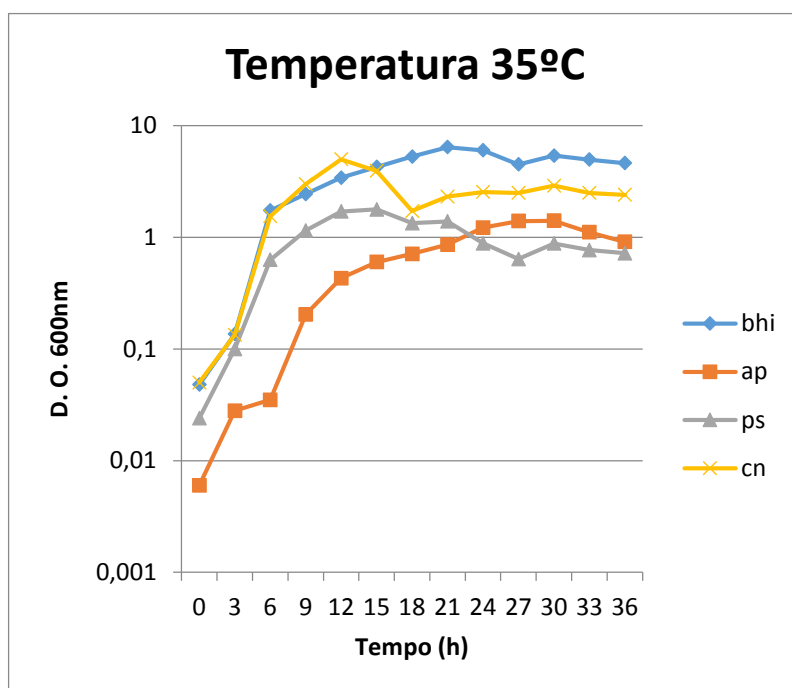


Figura 9: Curvas de crescimento do isolado S114d a 35°C para os meios de cultura BHI, CN, AP e PS.

Segundo os resultados obtidos verifica-se que a produção de bacteriocinas ocorre na fase estacionária do crescimento bacteriano, quando se atinge o maior valor de biomassa. Alguns estudos apresentam resultados semelhantes., em que a produção máxima de atividade antimicrobiana coincide com o máximo de produção de biomassa, no final da fase exponencial (Cladera-Olivera, et al, 2004).

A cinética da produção de substâncias antimicrobianas mostra que a sua síntese e/ou secreção começam na transição da fase exponencial para a fase estacionária, atingindo um máximo de atividade na fase estacionária (Beric, et al. 2013).

Alguns estudos mostram que existe correlação entre a produção de biomassa e a produção de substâncias antimicrobianas, indicando que estas são metabolitos primários (Parente, et al. 1994).

Por outro lado Motta e Brandeli 2007 mostram que não é possível determinar uma relação entre a produção de bacteriocinas e as condições ótimas de crescimento da bactéria em estudos realizados em *B. licheniformis*. Um crescimento ótimo da cultura não indica uma produção máxima de bacteriocina, pois estas são produzidas consoante a

composição do meio de cultura e disponibilidade de nutrientes. Por vezes os meios de cultura mais ricos onde se observa maior crescimento bacteriano não são aqueles em que existe maior produção de bacteriocinas, sendo que a sua produção não depende da biomassa.

Antony, et al. 2009 defendem que bactérias como *B. licheniformis* podem expressar diferentes moléculas com atividade antimicrobiana dependendo das condições do meio de cultura e do período de crescimento.

O facto de alguns isolados não apresentarem atividade antimicrobiana em meio líquido mas apresentarem em meio sólido poderá estar relacionado com os mecanismos de *quorum-sensing* que regulam o crescimento e densidade microbiana e produção de metabolitos. Estudos mostram que a expressão de vários genes relacionados com a síntese de bacteriocinas é controlada por um sistema de *quorum-sensing* (Fontaine, et al. 2007).

A produção de péptidos antimicrobianos em algumas bactérias Gram-positivas é regulada pela densidade celular (Stein 2005) (Wang, et al. 2014) (Kleerebezem 2004). A produção de péptidos antimicrobianos é geralmente iniciada a meio ou no fim da fase logarítmica do crescimento e atinge o máximo no começo da fase estacionária. Em muitos casos tem sido mostrado que este modo de regulação envolve péptidos autoindutores que são secretados pelas células e que atuam como moléculas de comunicação. Estes péptidos autoindutores acumulam-se no meio extracelular durante o crescimento e quando atingem o limiar da concentração conduzem à expressão de péptidos antimicrobianos (Kleerebezem 2004).

Estudos indicam que a presença de um agente gelificante no meio de cultura, como gelatina ou agar pode causar em alguns casos um aumento da produção de substâncias antimicrobianas (Martirani, et al. 2002). Isto poderá indicar que a imobilização das células conduz a um aumento da densidade nesse local, potenciando os mecanismos de regulação por *quorum-sensing*. Este facto poderá estar relacionado com a observação feita nos isolados de *Bacillus sp.* testados, que apresentaram um largo espectro de atividade em meio sólido mas não no sobrenadante das culturas em meio líquido.

Em períodos de incubação mais longos (durante a fase estacionária) a atividade antimicrobiana do sobrenadante não é detetada. Esta diminuição da atividade poderá indicar que para cada estirpe, a expressão destas moléculas se faz num momento definido da sua curva de crescimento. As estirpes de *B. licheniformis* são conhecidas por

produzirem proteases extracelulares, o que pode levar a uma redução da atividade antimicrobiana nos estádios mais tardios da fase estacionária devido a degradação proteolítica (Guo, et al. 2012).

Pode-se afirmar que a produção de substâncias antimicrobianas é influenciada pelas condições de crescimento nomeadamente a composição do meio de cultura e a temperatura de incubação.

4.5. Concentração e fracionamento

Realizou-se um fracionamento do sobrenadante livre de células, obtido da cultura do isolado S114d. Utilizaram-se unidades de ultrafiltração *Centricon* com membranas de diferentes *cut-off*, 3kDa, 10kDa e 30kDa. Obtiveram-se 4 frações com concentração final 10 vezes superior à do sobrenadante utilizado inicialmente (menor que 3kDa, entre 3 e 10kDa, entre 10 e 30kDa e maior que 30kDa) que foram filtradas em membrana de acetato de celulose e testadas pelo método de difusão em agar (AWDA) contra *M. luteus*.

Os resultados obtidos mostram que 3 das frações testadas (3-10kDa, 10-30kDa e >30kDa) tiveram atividade contra *M. luteus*, mas com diferentes tamanhos dos halos de inibição. A fração menor que 3kDa não apresentou inibição contra *M. luteus*.



Figura 40: AWDA contra *M. luteus* com as frações concentradas do sobrenadante de S114d; <3kDa não apresenta halo de inibição; 3-10kDa com halo de inibição de 7mm; 10-30kDa com halo de inibição de 10mm; >30kDa com halo de inibição de 8mm.

Podemos estar perante 3 moléculas com diferentes massas moleculares, que são eficientemente separadas por ultrafiltração. Alguns autores observaram que as estirpes de *Bacillus sp*, incluindo *B. licheniformis* podem produzir mais do que um tipo de molécula antimicrobiana ativa com diferentes tamanhos moleculares (Anthony, et al. 2009).

Também podemos estar perante uma situação em que a molécula não tenha sido eficientemente separada pelas unidades de filtração fazendo com que a molécula ativa ficasse dispersa pelas 3 frações. Estas frações concentradas foram testadas contra a bactéria *S. aureus* pois pensava-se que no teste de difusão em agar realizado previamente a molécula ativa não tivesse atingido a concentração inibitória mínima. O resultado neste teste também foi negativo, mostrando que não se tratava de uma questão de concentração mas que o isolado S114d não apresenta atividade contra a bactéria *S. aureus* em meio líquido, nas condições de cultura utilizadas.

4.6. Estabilidade térmica e sensibilidade a enzimas hidrolíticas

Avaliou-se a estabilidade térmica das moléculas ativas do sobrenadante livre de células do isolado S114d submetendo-o a incubações a diferentes temperaturas e testando posteriormente pelo método de difusão em agar contra *M. luteus*.

Observou-se que no sobrenadante livre de células não concentrado houve uma diminuição de atividade até aos 80°C e que a atividade desaparece acima desta temperatura. Para as frações com tamanho compreendido entre 3 a 10 kDa e 10 a 30kDa não há diminuição da atividade inibitória, mantendo-se mesmo à temperatura de 121°C indicando grande estabilidade térmica nestas concentrações mais elevadas. Na fração superior a 30kDa observa-se uma diminuição da atividade inibitória com a subida da temperatura (Tabela 8) (Figuras em Anexo I).

Alguns autores descrevem um declínio de atividade com o aumento da temperatura, o que se verifica nos resultados obtidos para a fração superior a 30kDa (Guo, et al. 2012) (Kindoli, et al, 2012). Também existem autores que referem o desaparecimento da atividade aos 121°C, o que se verifica nos resultados para o sobrenadante livre de células não concentrado (Bizani e Brandelli, 2002) (Cladera-Olivera, et al. 2004).

Tabela 8: Teste de sensibilidade térmica a temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C e 121°C para o sobrenadante livre de células de S114d para as frações concentradas 3-10kDa, 10-30kDa e >30kDa. AWDA realizado contra *M. luteus*. Diâmetro do halo de inibição em mm.

temperatura	S114d	3-10kDa	10-30kDa	Maior 30kDa
40°C	7 mm	10 mm	18 mm	12 mm
50°C	7 mm	10 mm	18 mm	11 mm
60°C	7 mm	10 mm	18 mm	10 mm
70°C	7 mm	10 mm	18 mm	10 mm
80°C	7 mm	10 mm	18 mm	10 mm
90°C	0 mm	10 mm	18 mm	10 mm
100°C	0 mm	10 mm	18 mm	10 mm
121°C	0 mm	10 mm	18 mm	7 mm

A estabilidade térmica a elevadas temperaturas não é muito comum nas bacteriocinas de bactérias lácticas, o mesmo já não acontece nas bacteriocinas de *Bacillus sp.*. Normalmente estas moléculas tem pequenas dimensões e são estáveis até à temperatura de 100°C (Kindoli, Lee e Kim 2012).

Alguns autores referem a existência de bacteriocinas resistentes a temperatura de 120°C com um tamanho de 5,6kDa. (Singh, et al. 2012) A pumicilina 4, bacteriocina descrita produzida por *Bacillus pumillus* é resistente a temperatura de 121°C. Pode-se afirmar que existe uma grande variedade e complexidade referente as bacteriocinas produzidas por bacillus no que diz respeito à estabilidade térmica (Bizani e Brandelli, 2002) (Cladera-Olivera, et al, 2004).

Foi demonstrado que moléculas antimicrobianas com menor massa molecular tem estabilidade moderada à temperatura, como o caso da bacilocina 490 (massa molecular de 2kDa) que mostrou alguma estabilidade térmica mantendo 46,4% de atividade após 1 hora a 100°C (Martirani, et al. 2002). A estabilidade térmica das bacteriocinas pode ser vista como uma aplicação promissora na indústria alimentar. A resistência a altas temperaturas pode ser utilizada como agente terapêutico ou como agente antimicrobiano complementar da nisina contra algumas espécies de *Bacillus sp.* causadoras de degradação nos alimentos.

A bacteriocina BL8 é um exemplo de uma molécula ativa que perde a atividade quando exposta a temperaturas de 121°C por 15 minutos mas que mantém a atividade entre os 40°C e 100°C por períodos de 30 minutos (Smitha e Bhat 2012).

Realizou-se um estudo para averiguar a sensibilidade da molécula ativa a enzimas proteolíticas. Para tal utilizou-se o sobrenadante da cultura livre de células do isolado S114d e também das 3 frações concentradas que apresentaram atividade inibitória. Verificou-se que as amostras testadas possuem sensibilidade à ação da proteinase K e da Tripsina. A tripsina digeriu as moléculas ativas do sobrenadante livre de células não concentrado, da fração concentrada entre 3 a 10kDa e da fração entre 10 a 30kDa. A fração maior que 30kDa não foi totalmente digerida mas observa-se uma diminuição do halo de inibição (Figura 11).

As amostras não foram totalmente digeridas pela proteinase K, mas observa-se claramente uma diminuição do halo de inibição, exceto para o sobrenadante livre de células não concentrado que foi totalmente digerido. Sabemos que o meio de cultura utilizado BHI é muito rico em proteínas e que neste meio as bactérias tem um aumento da produção de proteínas e outros metabolitos, o que pode dificultar a digestão enzimática da molécula ativa uma vez que todas estas proteínas também sofreram degradação por parte da protéase. O facto de as amostras estarem concentradas também contribui para a não digestão total das moléculas ativas, podendo ser necessário uma concentração ainda maior de enzima. Após submeter a amostra a um processo de purificação seria de grande interesse e importância testar a molécula purificada novamente com enzimas proteolíticas. Alguns *Bacillus sp.* produzem substâncias antimicrobianas que são péptidos cíclicos que contêm aminoácidos incomuns que causam maior resistência à ação das protéases, impedindo a degradação das moléculas ativas (Bizani e Brandelli, 2004) (Cladera-olivera, 2004).

Já foram descritas moléculas antimicrobianas resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como o caso da A89, produzida por *B. licheniformis* em que nenhuma das protéases testadas contra esta molécula fez diminuir a sua atividade antimicrobiana (Mendo, et al. 2004).

A bacteriocina bacilocina 490 foi completamente inativada por 1mg/ml de pronase E e proteinase K, mas não foi inativada pela mesma quantidade de tripsina ou quimiotripsina (Martirani, et al. 2002).

As estirpes de *Bacillus sp.* tem a capacidade de produzir várias moléculas com diferentes resistências a enzimas proteolíticas e com estabilidade a altas temperaturas (Smitha e Bhat 2012).

Os resultados indicam que estamos na presença de uma molécula do tipo BLIS – Bacteriocin - Like Inibitory Substances, a atividade inibitória deve-se à presença de moléculas de natureza proteica, pois apesar de mostrarem grande estabilidade térmica são suscetíveis de degradação por enzimas proteolíticas. Os resultados de outros autores são semelhantes aos obtidos verificando-se que as moléculas ativas são digeridas enzimaticamente pelas mesmas enzimas utilizadas neste teste (Bizani e Brandelli, 2002) (Aunpad e Na-Bangchang 2007) (Salum, et al. 2012).

A molécula ativa estudada neste trabalho possui propriedades semelhantes a outras moléculas classificadas como bacteriocinas classe II, segundo o sistema de classificação de bacteriocinas produzidas por *Bacillus* proposto por Abriouel, et al. 2011.

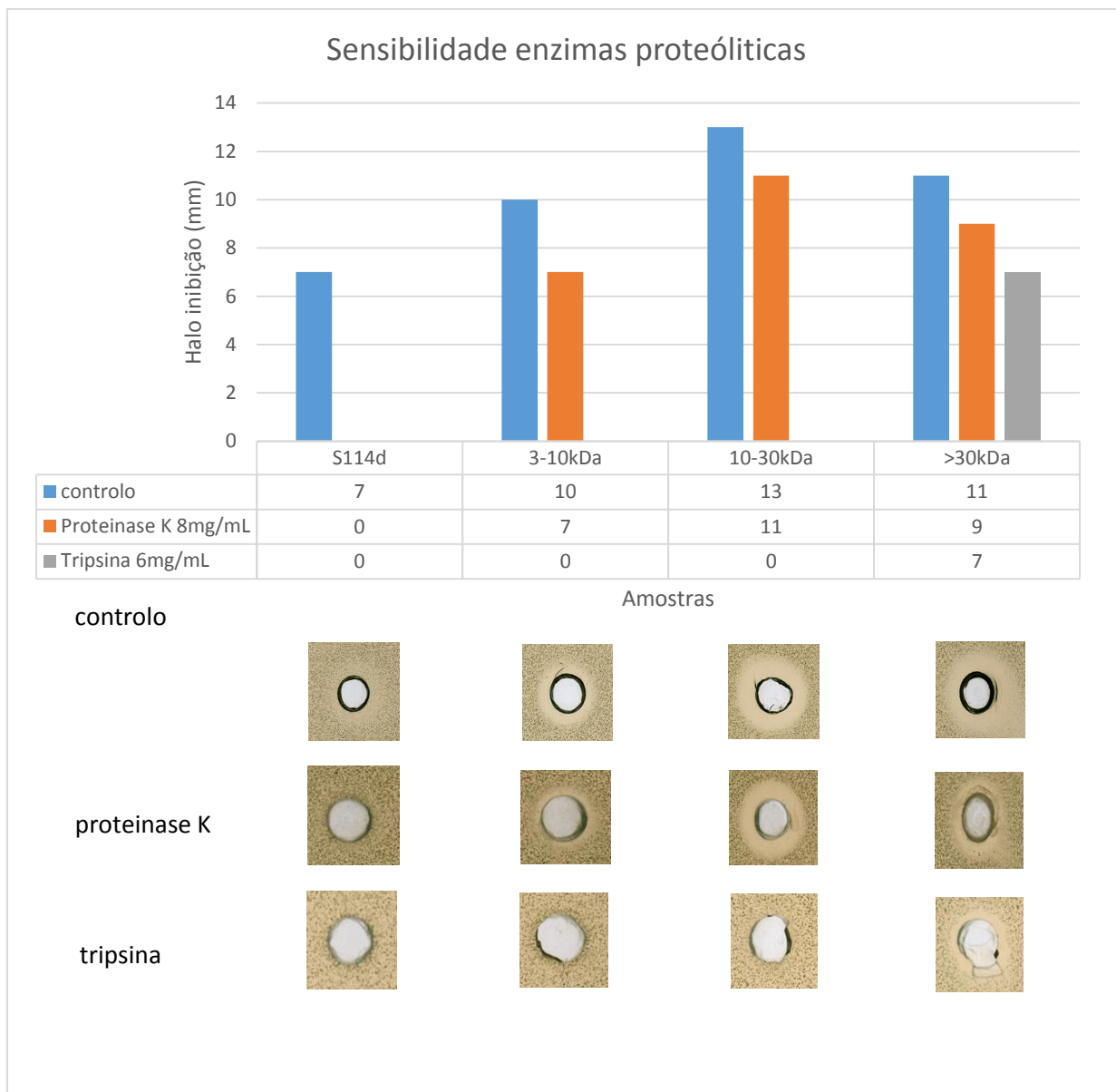


Figura 11: Teste de sensibilidade a enzimas proteolíticas. Sobrenadante livre de células e frações concentradas 3-10kDa, 10-30kDa e >30kDa tratadas com proteinase K e tripsina. Teste em AWDA contra *M. luteus*. Diâmetro dos halos de inibição em mm.

4.7. Indução da atividade antimicrobiana de S114d

Testou-se o efeito indutor da presença de outras bactérias ou dos seus produtos metabólicos na produção de moléculas com atividade antimicrobiana em S114D. Realizaram-se testes de indução da atividade antimicrobiana com as bactérias *B. licheniformis* e *S. aureus*.

Testou-se a indução da produção de substâncias ativas com adição de sobrenadante livre de células de *B. licheniformis* e com *B. licheniformis* inativado pelo

calor, a meio da fase exponencial. Repetiu-se o procedimento com *S. aureus*. O sobrenadante livre de células do isolado S144d sem indução foi utilizado como controlo. O sobrenadante das culturas de S114D, obtido após as várias condições de indução, foi testado em teste de difusão em agar contra *M. luteus* e contra *B. licheniformis*. Observou-se que no teste contra *M. luteus* houve um ligeiro aumento da atividade antimicrobiana. (aumento de 2 mm no halo de inibição comparado com o controlo, correspondendo a um aumento de 25%) tanto para o sobrenadante livre de células assim como para as bactérias inativadas pelo calor. No teste contra *B. licheniformis* não se observou atividade inibitória. (o controlo e as amostras induzidas não apresentaram halo de inibição). A indução da produção de substâncias antimicrobianas parece não ser específica para a espécie com a qual se realizou a indução.

Também se testou o sobrenadante após a indução realizada com *S. aureus* em teste de difusão de agar contra o próprio *S. aureus* e contra *M. luteus*. As amostras testadas contra *S. aureus* não apresentaram atividade antimicrobiana não se observando halo de inibição. As amostras induzidas pelo sobrenadante livre de células de *S. aureus* e pelas suas bactérias inativas apresentaram um halo de inibição de 9mm contra *M. luteus* assim como o controlo utilizado.

Martinez-Cardenas, et al. 2011 realizaram estudos de indução da produção de substâncias antimicrobianas semelhantes com *Bacillus thuringiensis* induzidos com o sobrenadante livre de células de *B. cereus* e com as bactérias inativas de *B. cereus* em que se observava um incremento da atividade antimicrobiana. Pode-se constatar que os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro ao resultados de Martinez-Cardenas, et al. 2011. Através da análise da Tabela 5 podemos constatar que o isolado S114d tem um perfil de ARDRA semelhante ao de *B. licheniformis*. Sabe-se que as bactérias tendem a produzir substâncias antimicrobianas contra outras bactérias filogeneticamente próximas. Nos resultados obtidos observa-se um aumento da produção de substâncias antimicrobianas quando o isolado S114d é induzido com outro *B. licheniformis*.

Na indução realizada com *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva filogeneticamente mais distante, não se observou aumento de atividade, nem para *S. aureus* nem para *M. luteus*. Um resultado semelhante foi obtido por Beric, et al, 2013, que testou a indução da atividade em *B. licheniformis* por co-inoculação com *B. subtilis*. Estes resultados apontam para a grande diversidade de mecanismos de regulação da

expressão das bacteriocinas em *Bacillus sp.* que não são completamente conhecidos, assim como o papel dos mecanismos de *quorum-sensing*.

Tabela 9: Indução da atividade antimicrobiana de S114d. Indução realizada com *B. licheniformis* (sobrenadante livre de células e bactéria inativa) testado em AWDA contra *M. luteus* e *B. licheniformis*; Indução realizada com *S. aureus* (sobrenadante livre de células e bactéria inativa) testado em AWDA contra *M. luteus* e *S. aureus*. Atividade expressa pelo diâmetro do halo de inibição em mm.

Indução com <i>B. licheniformis</i>				Indução com <i>S. aureus</i>			
AWDA	Sobrenadante	Bactéria inativa	Controlo S114d	AWDA	Sobrenadante	Bactéria inativa	controlo S114d
<i>M. luteus</i>	10	10	8	<i>M. luteus</i>	9	9	9
<i>B. licheniformis</i>	0	0	0	<i>S. aureus</i>	0	0	0

4.8. Purificação parcial

Utilizou-se uma fração de sobrenadante com tamanho superior a 10kDa cerca de 150 vezes concentrada em relação ao sobrenadante da cultura, para a realização de uma cromatografia de troca iónica Hitrap Cato Q. Testaram-se as frações recolhidas e observou-se que o pico 3 correspondente às frações 12, 13 e 14 apresentava atividade antimicrobiana contra *M. luteus*(Figura 12).

Com o pico ativo da cromatografia anterior realizou-se uma cromatografia de troca iónica em coluna Hitrap Q. Dividiram-se as frações recolhidas em 3 picos e testaram-se pelo método de difusão em agar contra *M. luteus*. Verificou-se que os 3 picos apresentavam atividade inibitória sobre *M. luteus* e escolheu-se o pico 3 (frações 11 e 12 da Hitrap Q) (Figura 13) para realizar uma cromatografia de exclusão molecular Gel Filtration. As frações desta cromatografia foram recolhidas e testadas no método de difusão em agar e verificou-se que nenhuma fração apresentava atividade inibitória contra *M. luteus*.

Existem várias hipóteses para o desaparecimento da atividade antimicrobiana no processo de separação e purificação. Uma hipótese a considerar é de que poderá ter havido adsorção das moléculas ativas à coluna de cromatografia, dificultando a eluição. Podemos também considerar que a concentração mínima inibitória da molécula ativa poderia estar abaixo do seu valor mínimo, estando muito diluída nas frações recolhidas.

Durante o processo de concentração e diálise das frações de cromatografia pode ter ocorrido adsorção das moléculas ativas às membranas dos *Centricons*, ficando retidas.

A molécula ativa pode ser constituída por um complexo proteico que só tem atividade antimicrobiana quando está unido e que pode estar a ser separado durante a purificação, perdendo assim a atividade antimicrobiana.

Esta situação foi relatada por alguns autores, que inicialmente pensavam estar na presença de uma BLIS com tamanho superior a 150kDa devido ao seu volume de eluição em Sephadex G-100. Contudo, na presença de 1,5M de NaCl a atividade correspondia ao volume de eluição de 20kDa. Estes dados podem indicar que as BLIS são secretadas como grandes aglomerados moleculares, como no caso da linocina M18 produzida por *Brevibacterium linens*. A mesma situação foi descrita para a cereína 7 produzida por *B. cereus*. A associação de moléculas de bacteriocinas em grandes agregados moleculares é possível devido à natureza hidrofóbica dos péptidos constituintes (Bizani e Brandelli 2004) (Motta e Brandelli 2008) (Cladera-Olivera, et al. 2004).

Outra hipótese a considerar é de que a molécula ativa poderá ser de pequenas dimensões, que inicialmente está associada a outras moléculas que se vão dissociando com no processo de purificação e que ficam diluídas por várias frações

Geralmente as bacteriocinas são moléculas de pequenas dimensões que podem variar entre pequenos péptidos, maioritariamente inferior a 10kDa, havendo no entanto alguns exemplos de moléculas com de peso molecular de 90kDa (Abriouel, et al. 2011) (Smitha e Bhat 2012). Existe uma grande probabilidade de que a molécula ativa tenha um tamanho inferior a 10kDa e seria necessário recorrer a técnicas de HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) que possibilitam a purificação de moléculas com dimensões muito reduzidas.

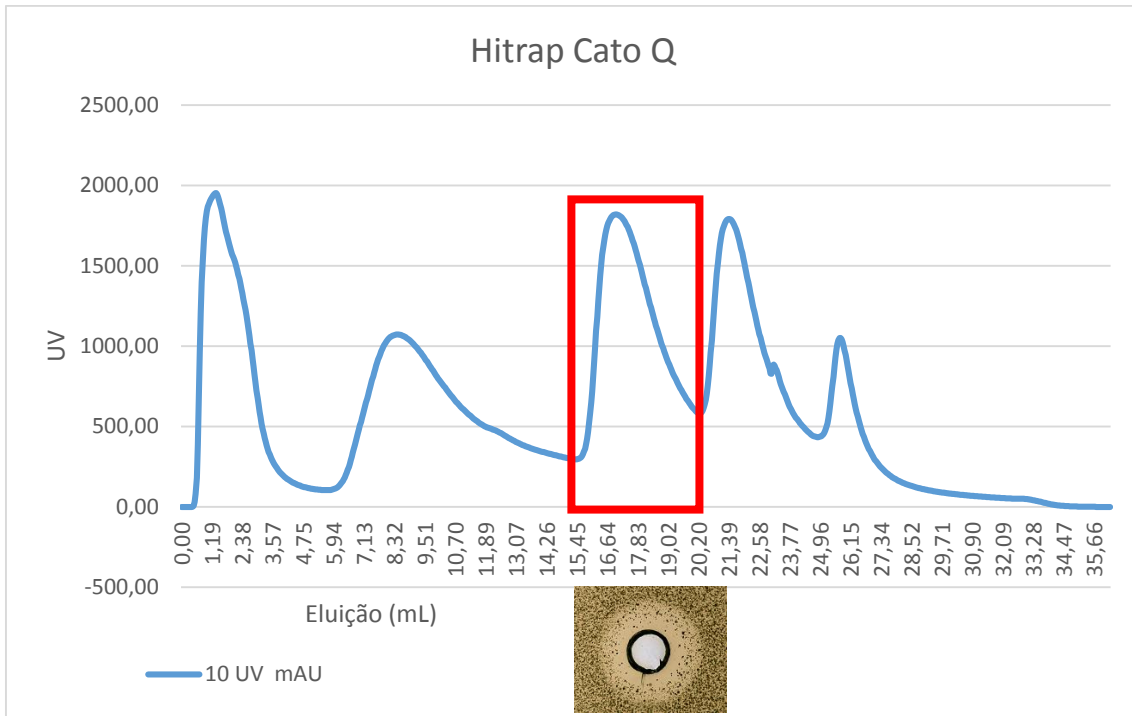


Figura 12: Cromatograma obtido em coluna de troca iônica Hitrap Cato Q. Destaca-se o pico 3 (frações 12, 13 e 14) com atividade positiva em teste de difusão em agar contra *M. luteus*.

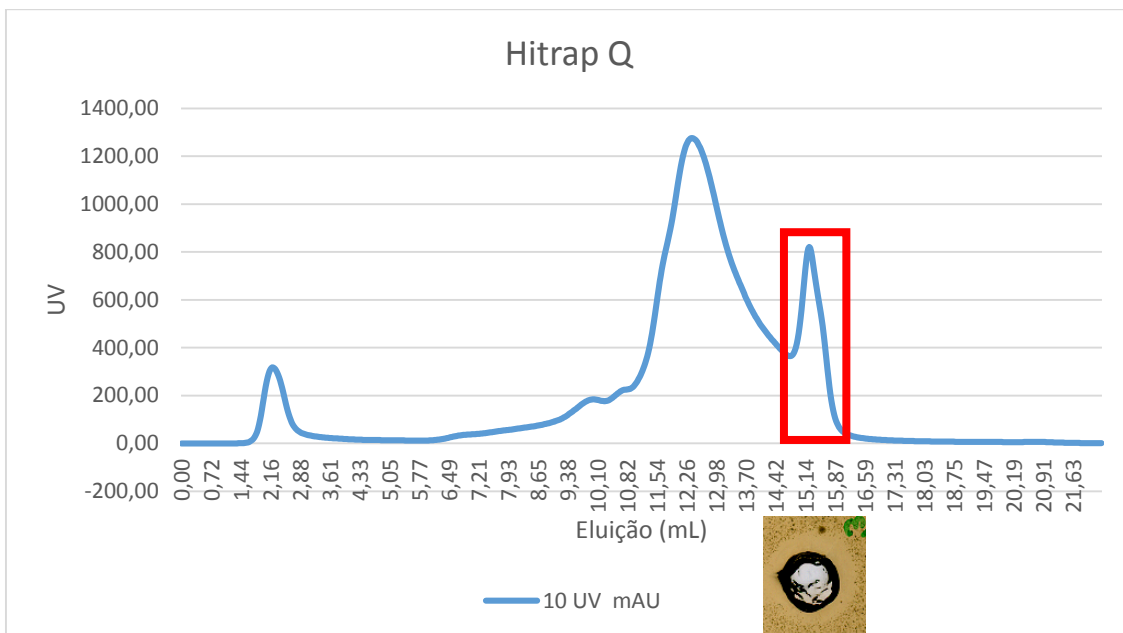


Figura 13: Cromatograma obtido em coluna de troca iônica Hitrap Q. Destaca-se o pico 3 (frações 11 e 12) com atividade positiva em teste de difusão em agar contra *M. luteus*.

4.9. Amplificação e sequenciação de um fragmento do gene 16s do isolado S114d

A amplificação de um fragmento do gene 16S foi realizado com *primers* específicos para o género *Bacillus* e para géneros filogeneticamente próximos B-K1/F,5'-TCACCAAGGCRACGATGCG3' e B-K1/R1,5'CGTATTCACCGCGGCATG-3'. Obteve-se um fragmento com tamanho aproximado de 1114bp que foi sequenciado.

Após a sequenciação analisou-se a sequência consenso obtida (Anexo III) usando BLASTN para o fragmento do gene 16S, obtendo-se uma homologia de 99% com fragmentos de gene 16S de várias estirpes de *Bacillus licheniformis*. Este resultado indica que o isolado S114d pertence à espécie *B. licheniformis*.

Também houve grande homologia com o *Bacillus sonorensis*, que é uma espécie próxima do *B. licheniformis*, e com *Bacillus aerius*. Excluíram-se estas hipóteses devido às condições do meio onde estes microrganismos crescem. *B. sonorensis* é originário de um deserto onde cresce com grandes concentrações de sais e o *B. aerius* foi descoberto na estratosfera a 24Km de altitude (Palmisano, et al. 2001) (Shiraji, et al. 2006).

Tabela 10: Homologia da sequência consenso de um fragmento do gene 16S do isolado S114d

Descrição	Score Total	Valor E	Identidade	Número de acesso
<i>B. licheniformis</i> strain BL-09	12385	0.0	99%	CP010524.1
<i>B. licheniformis</i> SCKB	1775	0.0	99%	KJ469794.1
<i>B. licheniformis</i> OALB2	1770	0.0	99%	KP772335.1
<i>Bacillus sonorensis</i> CCMMB987	1770	0.0	99%	KF879301.1
<i>Bacillus aerius</i> CCMMB968	1770	0.0	99%	KF879293.1

As bacteriocinas produzidas por *B. licheniformis* apresentam grande variabilidade em peso molecular, sensibilidade a temperatura e enzimas proteolíticas (Abriouel, et al. 2011). A bacilicina 490 tem um peso molecular de 2kDa e apresenta grande estabilidade térmica aos 100°C, sendo inativada pela proteinase K, tripsina e pronase E. O péptido

A89 tem um peso molecular de 3kDa, apresenta também apresenta estabilidade térmica aos 100°C é digerido pela pronase E, mas não é sensível à ação da tripsina. A BLIS estudada neste trabalho possui características semelhantes às aquelas estudadas para estirpes de *B. licheniformis*, apresentando resistência à degradação pela proteinase K e estabilidade térmica aos 121°C. Esta molécula poderá ter aplicações na área da indústria alimentar como conservante natural devido à sua resistência a altas temperaturas e a enzimas proteolíticas. Também poderá ser utilizada nas novas tecnologias que recorrem à incorporação destas moléculas em nanomateriais.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A Coleção de Bactérias Esporulantes dos Açores é constituída por isolados que produzem uma grande diversidade de moléculas ativas, incluindo moléculas com atividade antimicrobiana. Foram escolhidos 5 isolados deste banco de bactérias para estudar as condições de produção de atividade antimicrobiana em cultura líquida. Apenas o isolado S114d apresentou atividade antimicrobiana contra *M. luteus* em meio líquido e foram otimizadas as condições de crescimento e de produção de substâncias antimicrobianas para este isolado. Verificou-se que a produção de atividade antimicrobiana é máxima após 18h de crescimento, em meio Brain Heart Infusion, a 30°C e 200 rpm.

A análise da sequência consenso de um fragmento do gene 16S do isolado S114d confirmou que este é uma estirpe de *Bacillus licheniformis*.

Verificou-se que o sobrenadante livre de células do isolado S114d e as frações concentradas de sobrenadante apresentam moléculas ativas com elevada estabilidade térmica. As frações 3-10kDa e 10-30kDa mantêm a atividade após tratamento térmico a 121°C mas a fração >30kDa apresenta uma diminuição da atividade antimicrobiana a essa temperatura. O sobrenadante livre de células perde a atividade a temperaturas superiores a 80°C. Estas moléculas apresentam alguma sensibilidade a enzimas hidrolíticas. Verificou-se perda total de atividade inibitória na amostra de sobrenadante e nas frações 3-10kDa e 10-30kDa tratadas com tripsina. A fração >30kDa apresentou apenas diminuição de atividade. As amostras submetidas a tratamento enzimático com proteinase K apenas apresentaram uma pequena diminuição da atividade inibitória, exceto o sobrenadante livre de células no qual se verificou uma total digestão das moléculas ativas. Tendo em conta estes dois aspetos, e comparando com resultados obtidos por outros autores, para moléculas produzidas por outras estirpes de *B. licheniformis*, podemos concluir que estas moléculas são de natureza proteica, podendo ser classificadas como BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Substances).

As culturas de D114d induzidas com células inativadas e produtos metabólicos de *B. licheniformis* DSM13, mostraram um aumento de 25% na atividade antimicrobiana contra bactéria *M. luteus*.

O fracionamento do sobrenadante de S114d, por cromatografia de troca iónica e exclusão molecular, permitiu identificar frações com moléculas ativas contra *M.luteus*.

Estes processos de separação não permitiram a obtenção de uma molécula pura. Para tal será necessário continuar o processo de purificação, utilizando outras técnicas de cromatografia. A purificação da molécula ativa irá permitir determinar a concentração mínima inibitória (MIC), a caracterização por espectrofotometria de massa, a sequenciação do N-terminal e o estudo do modo de ação. Esta caracterização será fundamental na avaliação de futuras aplicações destas BLIS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, Hikmate, Charles Franz, Nabil Omar, e Antonio Gálvez. 2011. "Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins." *FEMS Microbiol Rev*, 35: 201-232.
- Allen, Heather K, Julian Trachsel, Torey Looft, e Thomas A Casey. 2014. "Finding Alternatives to Antibiotics." *Annals of the New York Academy of Sciences*.1323:91-100.
- Anthony, T, T Rajesh, N Kayalvizhi, e P Gunasekaran. 2009. "Influence of medium - components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9." *BioresourceTechnology*, 100: 872-877.
- Aunpad, R, e K Na-Bangchang. 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.
- Barbosa, Teresa, Cláudia R. Serra, Roberto M. Ragione, Martin J. Woodward, e Adriano O. Henriques. 2005. "Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract." *Applied and Environmental Microbiology*,71: 968-978.
- Benitez, L, K Caumo, A Brandelli, e M Rott. 2011. "Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*." *Parasitol Res*,108: 687-691.
- Beric, T, S Stankovic, V Draganic, M Kojic, J Lozo, e D Fira. 2013. "Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample." *Journal of Applied Microbiology*, 116:502-510.
- Bizani, D, e A Brandelli. 2002. "Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Strain 8A." *Journal of Applied Microbiology*, 93: 512-519.
- Bizani, D, e A Brandelli. 2004. "Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation." *Appl Microbiology Biotechnology*, 65: 158-162.
- Caetano, Tânia, Joanna Krawczyk, Eva Mosker, Roderich Sussmuth, e Sónia Mendo. 2011. "Heterologous Expression, Biosynthesis, and Mutagenesis of Type II Lantibiotics from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*." *Chemistry & Biology*, 78: 90-100.
- Cladera-Olivera, F, G Caron, e A Brandelli. 2004. "Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40." *LettersinAppliedMicrobiology*, 38: 251-256.
- Cleveland, J, T J Montville, I F Nes, e M L Chikandas. 2001. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.
- Cotter, Paul D, R Paul Ross, e Colin Hill. 2013. "Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?" *Nature Reviews - Microbiology*, 11:95-105.
- Dobson, Alleson, Paul Cotter, R Paul Ross, e Colin Hill. 2012. "BacteriocinProduction: a Probiotic Trait?" *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 1-6.
- Fernández, E, A. S. Alegría, A., S. Delgado, e B. Mayo. 2010. "Phenotypic, genetic and technological characterisation of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese." *International Dairy Journal* , 72: 142-148

- Fontaine, L, Boutry, C, Guédon, E, Ibrahim, M, Grossiord, B e Hols, P. 2007. “Quorum-sensing regulation of the production of BIp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*.” *Journal of Bacteriology*, 189:7195-7205.
- Fuente-Salcido, N, Ma. Guadalupe Alanís-Guzmán, D.K. Bideshi, R Salcedo-Hernández, M Bautista-Justo, e J. E. Barbosa-Corona. 2008. “Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*.” *Arch Microbiol*, 42: 633-640.
- Garg, Neha, Weixin Tang, Yuki Goto, Satish K Nair, e Wilfred A van der Donk. 2012. “Antibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*.” *PNAS*, 109: 5241-5246.
- Guo, Yaoqi, Zhanqiao Yu, Jianhua Xie, e Rijun Zhang. 2012. “Identification of a New *Bacillus licheniformis* Strain Producing a Bacteriocin-Like Substance.” *The Journal of Microbiology*, 50: 452-458.
- He, Lili, Weiliang Chen, e Yang Liu. 2006. “Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12 .” *Microbiological Research*, 161: 321-326.
- Heunis, Tiaan, Osama Bshena, Bert Klumperman, e Leon Dicks. 2011. “Release of Bacteriocins from Nanofibers Prepared with Combinations of Poly(D,L-lactide) (PDLLA) and Poly(Ethylene Oxide) (PEO).” *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 2158-2173.
- Jeong, J, K Kim, S Jang, J Wou, M Hon, e D Kim. 2015. “Orally administered *Lactobacillus pentosus* var. *plasmotocum* C29 ameliorates age-dependent colitis by inhibiting the nuclear factor Kappa B signaling pathway via the regulation of lipopolysaccharide production by gut microbiota.” *PLOS ONE*,.
- Kamoun, F, I Fguira, N Hassen , H Mejdoub, D Lereclus, e S Jaoua. 2011. “Purification and Characterization of a New *Bacillus thuringiensis* Bacteriocin Active Against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*.” *ApplBiochemBiotechnol*, 165: 300-314.
- Kayalvizhi, N, e P Gunasekaran. 2008. “Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3.” *Letters in Applied Microbiology*, 47: 600-607.
- Kindoli, S, H A Lee, e J H Kim. 2012. “Properties of Bac W42, a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* W42 Isolated from Cheonggukjang.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1092-1100.
- Kleerebezem, Michiel. 2004. “Quorum sensing control of antibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis.” *Peptides*, 25: 1405-1414.
- Lee, H, e H Kim. 2011. “Antibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 229-235.
- Maqueda, M, M Hidalgo-Sánchez, M Fernández, e M López-Montalbán. 2008. “Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria.” *FEMS Microbiology Review*, 32: 22-32.
- Martirani, L, M Varcamonti, G Naclerio, e M Felice. 2002 “Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*.” *Microbial Cell Factories*,1.

- Martínez-Cardenas, J, Fuente-Salcido, N., Salcedo-Hernández, R. Bideshi, D e Barboza-Corona. J. 2011. "Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction." *J Ind Microbiol Biotechnol*.
- McCullen, L M, e M E Stiles. 1996. "Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats." *J. Food Prot.*, 55: 64-71.
- Mendo, S, N Faustino, A Sarmiento, F Amado, e A Moir. 2004. "Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain." *Biotechnology Letters*, 26: 116-119.
- Millis, S, C Staton, C Hill, e R. P. Ross. 2011. "New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods." *Annual Review of Food Science and Technology*, 2: 299-329.
- Moll, N, W Konings, e Driessen. 1999. "Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation." *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 185-198.
- Motta, A, e A Brandelli. 2008. "Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus sp.* strain P34." *World Journal Microbiology Biotcnhology*, 24: 641-646.
- Motta, Amanda, e Adriano Brandelli. 2007. "Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus sp.* strain P34 ." *World Journal Microbiology Biotechnology*, 188: 641-646.
- Palmisano, M, L Nakamura, K Duncan, C Istock, e F Cohan. 2001. "*Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona." *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1465-1473
- Parente, E, A Ricciardi, e G Addario. 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.
- Riley, Margaret, e John Wertz. 2002. "BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application." *Annual Review Microbiology*, 56: 117-137.
- Rosa, C. M., D. B. G. M. Franco, T. J. Montville, e M. L. Chikindas. 2002 "Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a brasilian sausage isolate, *Lactobacillus sake* 2a." *Journal of Food Safety*, 12: 39-54.
- Ryan, Máire, Mary Rea, Colin Hill, e Paul Ross. 1996. "An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis Producing* a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147." *Applied and Environmental Microbiology* , 62: 612-619.
- Salcido, N, M Guzmán, D Bideshi, R Hernández, M Justo, e J Corona. 2008. "Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*." *Arch Microbiol*, 44: 633-640.
- Salcido, Norma, et al. "Expanding the Use of a Fluorogenic Method to Determine Activity and Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Bacteriocins Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria." *The Scientific World Journal*, 2012.
- Saleem, Farah, Samia Ahmad, Zobia Yaqoob, e Sheikh Ajaz Rasool. 2009. "Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria." *Pak. J. Pharm*, 22: 252-258.

- Salum, K, H Lee, e J Kim. 2012. "Properties of Bac W42, a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* W42 Isolated from Cheonggukjang." *Journal of Microbiology and Biotechnololy*, 22: 1092-1100.
- Schulz, D, M Pereira, R Bonelli, M Nunes, e C Batista. 2003. "Bacteriocins: Mechanism of Action and use in Food Preservation." *Alim.Nutr, Araraquara*, 7: 229-235.
- Sebei, S, T Zendo, A Boudabous, J Nakayama, e K Sonomoto. 2007. "Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1." *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1621-1631.
- Serpil, Ugras, Kazim Sezen, Hatice Kati, e Zihni Demirbag. 2012. "Purification and Characterization of the Bacteriocin Thuricin Bn1 Produced by *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* Bn1 Isolated from a Hazelnut Pest." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 167-176.
- Sharma , Nivedita, e Neha Gautam. 2008. "Antibacterial activity and characterization of bacteriocin of *Bacillus mycoides* isolated from whey." *Indian Journal of Biotechnology*, 7: 117-121.
- Sharma, Nivedita, Riti Kapoor, Neha Gautam, e Ranjana Kumari. 2011. "Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* R75 Isolated from Fermented Chunks of Mung Bean (*Phaseolus radiatus*." *Food Technol. Biotechnology*, 49: 169-176.
- Shelburne, Charles, Florence An, Vishnu Dholpe, Ayyalusamy Ramamoorthy, Dennis Lopatin, e Marilyn Lantz. 2007. "The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 297-300.
- Shiraji, S, Chuturvedi, P, Suresh, K, Reddy, G, Dutt, S, Wainwright, M, Narlikar, J, e Bhargova, P. 2006. "*Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes." *Inter J Syst Microbiol*, 56: 1465-1473.
- Singh, Pradip, Chittputna, Ashish, Vikas Sharma, Prabhu .Patil, e Suresh Korpole. 2012. "Identification, Purification and Characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus* sp. Strain GI-9." *PLOS ONE*,.
- Smitha, S, e S G Bhat. 2012. "Thermostable Bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment." *Journal of Applied Microbiology*, 144: 688-694.
- Stein, Torsten. 2005. "*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions." *Molecular Microbiology*, 56: 845-857.
- Tagg, J R, e A R McGiven. 1971. "Assay System for Bacteriocins." *Applied Microbiology*, 21: 943.
- van der Ploeg, Jan R. 2005. "Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence." *Journal of Bacteriology*, 187: 3980-3989.
- van Staden, Anton Du Preez. 2011. "Developing bone cement implants impregnated with bacteriocins for prevention of infections." Stellenbosch University.

- Walker, R, A Powell, e B Seddon. 1998. “*Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species.” *Journal of Applied Microbiology*, 84: 791-801.
- Wang, Jian, Li Zhang, Kunling Teng, Shutao Sun, Zhizeng Sun, e Jin Zhong. 2014. “Cerecidins, Novel Lantibiotics from *Bacillus cereus* with Potent Antimicrobia lActivity.” *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 2613-2643.
- Wu, Xi-Yang, Mark J Walker, Michael Hornitzky, e James Chin. 2006. “Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance.” *Journal of Microbiological Methods*, 64: 107-119.
- Yang, Shih-Chun, Chih-Hung Lin, Calvin T Sung, e Jia-You Fang. 2014. “Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals.” *Frontiers in Microbiology*, 1.

Anexos

Anexo I

Teste estabilidade térmica

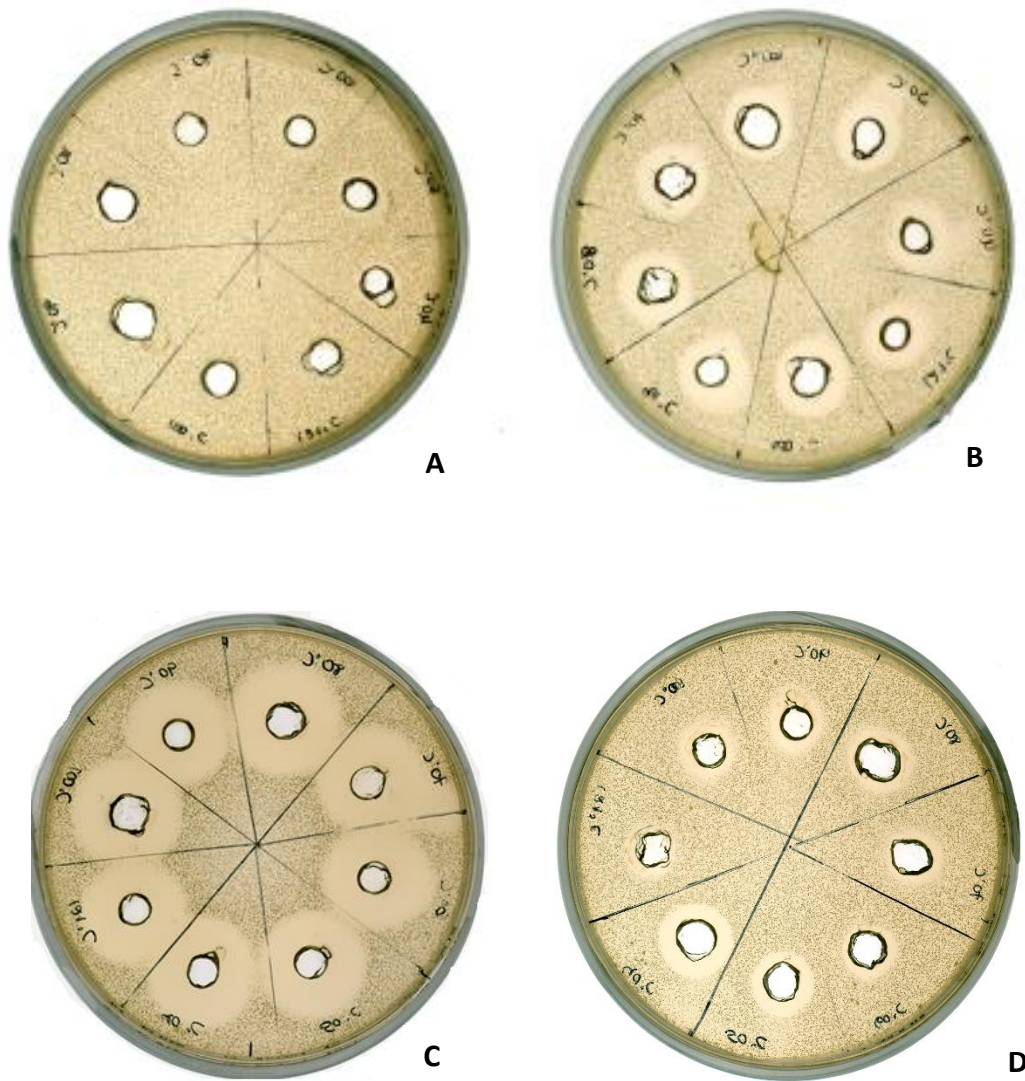


Figura 5: Estabilidade térmica. Foram testadas diversas amostras às seguintes temperaturas: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C por 30 minutos; 121°C por 20 minutos. A- Sobrenadante livre de células não concentrado do isolado S114d; B- Fração concentrada 3-10kDa; C- Fração concentrada 10-30kDa; D- Fração concentrada > 30kDa. As amostras foram testadas em teste de difusão em agar contra *M. luteus*.

Anexo II

Teste indução da atividade antimicrobiana de S114d

I



II



III



IV



Figura 6: Teste indução da atividade antimicrobiana (halos de inibição em mm). I- S114d induzido com *B. licheniformis* e testado em AWDA contra *M. luteus*: A – controlo 8mm, B – sobrenadante livre de células de *B. licheniformis* 10mm, C – *B. licheniformis* inativado 10mm; II- S114d induzido com *B. licheniformis* e testado em AWDA contra *B. licheniformis*: A – controlo 0mm, B – sobrenadante livre de células de *B. licheniformis* 0mm, C – *B. licheniformis* inativado 0mm; III- S114d induzido com *S. aureus* e testado em AWDA contra *M. luteus*: A – controlo 9mm, B – sobrenadante livre de células de *S. aureus* 9mm, C – *S. aureus* inativado 9mm; IV- S114d induzido com *S. aureus* e testado em AWDA contra *S. aureus*: A – controlo 0mm, B – sobrenadante livre de células de *S. aureus* 0mm, C – *S. aureus* inativado 0mm.

Anexo III

Sequência consenso do fragmento do gene 16S do isolado S114d

ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGGATC
GTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGG
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAAGCCGCGAGGCTAAGCCCAATCCCACAA
ATCTGTTCTC