

# **Pesquisa de péptidos antimicrobianos em isolados Açorianos de *Bacillus* com ação contra *Staphylococcus***

Dissertação de Mestrado

Sabrina da Silva Pacheco

Mestrado em  
**Ciências Biomédicas**



# **Pesquisa de péptidos antimicrobianos em isolados Açorianos de *Bacillus* com ação contra *Staphylococcus***

Dissertação de Mestrado

Sabrina da Silva Pacheco

## **Orientadores**

Professora Doutora Carla Manuela Machado Mendes Leite Cabral

*Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade dos Açores*

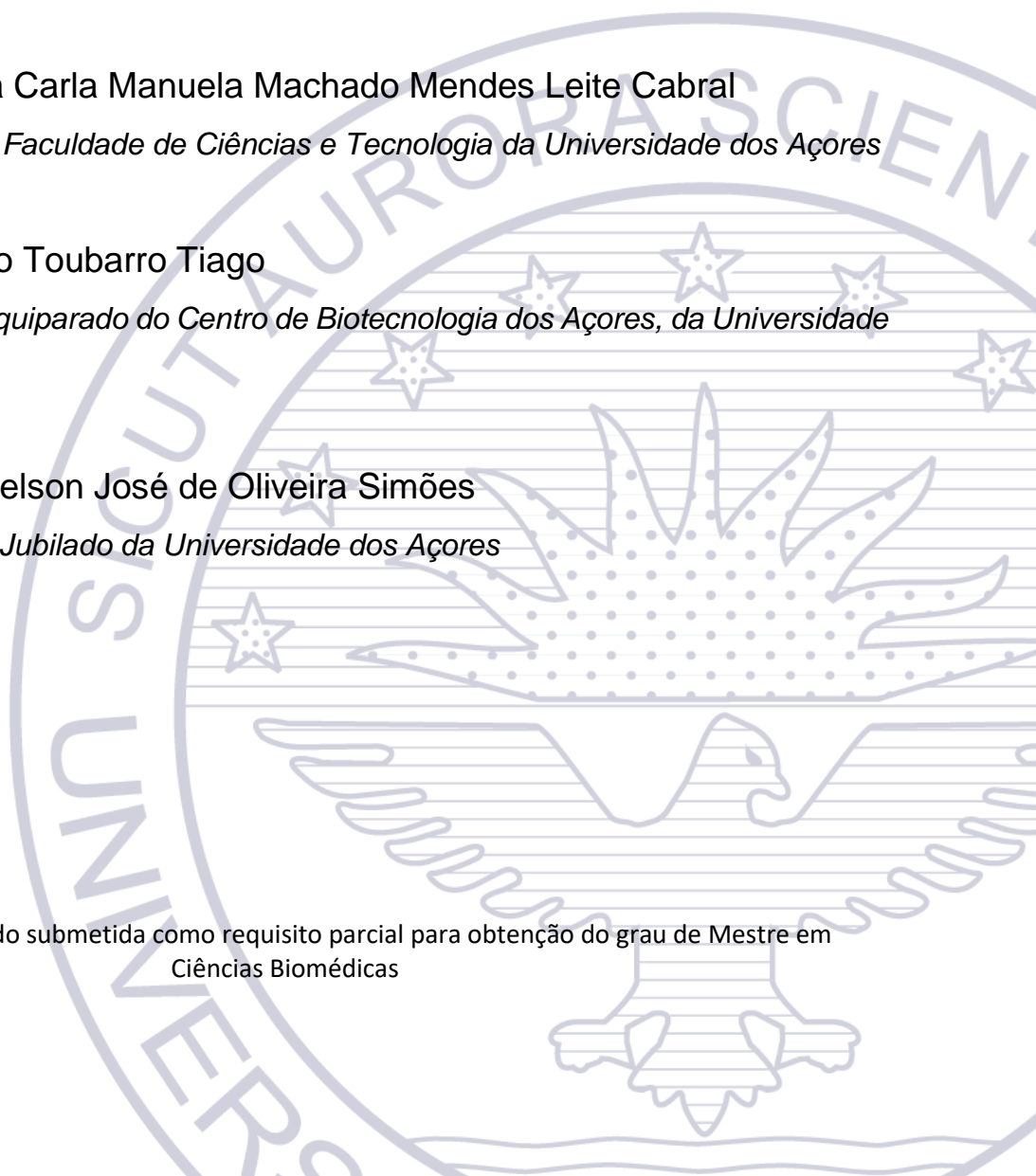
Doutor Duarte Nuno Toubarro Tiago

*Investigador Auxiliar equiparado do Centro de Biotecnologia dos Açores, da Universidade dos Açores*

Professor Doutor Nelson José de Oliveira Simões

*Professor Catedrático Jubilado da Universidade dos Açores*

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



---

# ÍNDICE

Índice de Figuras.....	III
Índice de Tabelas .....	V
Agradecimentos .....	VII
Resumo.....	VIII
Abstract .....	X
1. Introdução .....	1
2. Material e métodos .....	10
2.1. Cultura de Bactérias e Condições de Crescimento .....	10
2.1.1. Bactérias Produtoras .....	10
2.1.2. Bactérias Indicadoras .....	10
2.2. Detecção de Atividade Antimicrobiana nos Isolados .....	11
2.3. Obtenção das Moléculas Ativas em Cultura Líquida .....	12
2.4. Otimização da Produção por Imobilização das Células em Esferas de Agar.....	13
2.5. Concentração e Fracionamento dos Sobrenadantes .....	16
2.5.1. Centricon .....	16
2.5.2. Precipitação com 70% de Sulfato de Amónio.....	17
2.5.3. Precipitação com Solventes Orgânicos.....	17
2.6. Teste de Estabilidade Térmica .....	18
2.7. Teste de Sensibilidade à Ação Enzimática .....	19
2.8. Purificação por <i>Superdex Peptide</i> , C18 fase reversa e FPLC .....	20
2.8.1. Cromatografia em Gel .....	20
2.8.2. Cromatografia de Fase Reversa - C18.....	21
2.8.3. FPLC - Resource RPC 3mL .....	22
2.9. Quantificação Proteica .....	22
2.10. Espectrometria de Massa MALDI-TOF MS .....	23
2.11. Amplificação e Sequenciação do Gene 16S da Bactéria S118E.....	24
2.11.1. Extração de DNA por Lise Térmica.....	24
2.11.2. Amplificação 16S .....	24
2.11.3. Purificação do Produto de PCR.....	25
2.11.4. Sequenciação do 16S e Análise dos Resultados .....	25
2.12. Sequenciação do Genoma do Isolado S118E .....	26
2.12.1. Extração e Purificação do DNA Total .....	26

---

2.12.2.	Sequenciação do Genoma e Mineração Genómica .....	27
3.	Resultados e discussão .....	28
3.1.	Cultura dos Isolados .....	28
3.2.	Deteção de Atividade Antimicrobiana nos Isolados .....	28
3.3.	Obtenção das Moléculas Ativas em Cultura Líquida .....	30
3.3.1.	Sobrenadante dos 7 Isolados Seleccionados .....	30
3.3.2.	Otimização da Produção de 2 Isolados Através da Imobilização das Células em Esferas de Agar .....	32
3.3.3.	Aumento da Produção de Sobrenadante com Imobilização do Isolado S118E... ..	35
3.4.	Concentração e Fracionamento dos Sobrenadantes .....	39
3.5.	Teste de Estabilidade Térmica .....	41
3.6.	Teste de Sensibilidade à Ação Enzimática .....	43
3.7.	Purificação por <i>Superdex Peptide</i> , C18 Fase Reversa e FPLC.....	45
3.7.1.	Cromatografia em Gel .....	45
3.7.2.	Cromatografia de Fase Reversa – C18 .....	48
3.7.3.	FPLC – Resource RPC 3mL .....	50
3.8.	Tabela de Purificação.....	53
3.9.	Espetrometria de Massa MALDI-TOF MS .....	54
3.10.	Amplificação e Sequenciação do Gene 16S da Bactéria S118E.....	55
3.11.	Sequenciação do Genoma do Isolado S118E .....	57
3.11.1.	Extração do DNA.....	57
3.11.2.	Genoma .....	57
3.11.3.	Mineração Genómica do Isolado <i>Bacillus pumilus</i> .....	59
4.	Conclusões.....	65
5.	Referências Bibliográficas.....	68
Anexos .....	A	
Anexo I.....	B	
Anexo II.....	C	
Anexo III.....	D	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Aplicações das bacteriocinas produzidas por <i>Bacillus</i> spp. em diferentes setores (in Basi-Chipalu et al., 2021).....	5
<b>Figura 2</b> - Imagem ilustrativa dos riscados efetuados no teste de co-inoculação.....	12
<b>Figura 3</b> - Fotografia ao microscópio contraste de fase de células do isolado S118E inoculado em meio AN. Objetiva de 40x.....	28
<b>Figura 4</b> – Teste de co-inoculação do isolado S118E em AN com as bactérias alvo. Apresenta 20mm de inibição no <i>M. luteus</i> , 15mm de inibição no <i>S. aureus</i> e 10mm de inibição na <i>E. coli</i> . .....	29
<b>Figura 5</b> - Placa de agar mole de <i>M. luteus</i> usada no teste de difusão em agar das bactérias S53C, S117B e S150C produzidas em meio de cultura BHI e LB. 1- BHI S53C, 2- BHI S117B ,3- BHI S150C ,4- LB S53C , 5-LB S117B e 6- LB S150C . Halo de inibição no poço 5, S117B em meio LB.....	31
<b>Figura 6</b> - Placa de agar mole de <i>M. luteus</i> usada no teste de difusão em agar das bactérias S118E, S124A, S157B e S160A produzidas em meio de cultura LB. 1- S118E, 2-S124A ,3-S157B e 4-S160A. Halo de inibição no poço 1, S118E em meio LB. ....	31
<b>Figura 7</b> - Esferas de agar com o isolado S117B em 50mL de LB. ....	33
<b>Figura 8</b> - Inibição de crescimento nas bactérias alvo no teste de difusão em agar pelo sobrenadante filtrado do isolado S117B em 50mL de LB. ....	33
<b>Figura 9</b> - Inibição de crescimento nas bactérias alvo no teste de difusão em agar pelo sobrenadante filtrado do isolado S118E em 50mL de LB.....	34
<b>Figura 10</b> - Inibição de crescimento nas bactérias alvo no teste de difusão em agar pelo sobrenadante filtrado do isolado S118E em 100mL de LB.....	36
<b>Figura 11</b> - Avaliação da atividade antibacteriana em <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em microplaca representado pela Tabela 2. A – Batch 2; B – Batch 3; C – Batch 4; D – vazio; E – Controlo Batch 3 dos 50mL de produção; F e G – vazio; H – ampicilina 50µg/mL. Os poços 8-11 das filas A, B, C e E estão vazios. ....	37
<b>Figura 12</b> - Cromatograma obtido na primeira cromatografia de gel com a Superdex peptide 10/300 GL. Em destaque as frações 5, 12, 13, 15, 16 e 20 para fins de teste à atividade antimicrobiana. ....	46
<b>Figura 13</b> - Cromatogramas obtidos desde a segunda à sexta cromatografia de gel com a Superdex peptide 10/300 GL com indicação dos picos selecionados. ....	47
<b>Figura 14</b> - Cromatograma obtido na sétima e oitava cromatografia de gel com a Superdex peptide 10/300 GL do grupo de frações C. ....	47
<b>Figura 15</b> – Cromatogramas obtidos na primeira e segunda cromatografia com a coluna Resource RPC, sistema de FPLC, das amostras 30% C18 e 60% C18. ....	51
<b>Figura 16</b> - A Cromatogramas obtidos na primeira cromatografia de FPLC da amostra 30% C18 com indicação das frações selecionadas; B – Cromatograma obtido na segunda cromatografia de FPLC da amostra 60% C18 com indicação das frações selecionadas. A linha azul corresponde à absorvância a 280nm. A linha verde corresponde ao gradiente de acetona.....	52
<b>Figura 17</b> – Análise dos resultados de massa intacta das amostras 30% e 60% C18. As figuras à esquerda concernem à amostra 30% C18 e as figuras à direita às amostras 60% C18: A e B - cromatografias TIC (Total Ion Count); C e D – espectros para o tempo de retenção 7,54 minutos do cromatograma TIC; E e F – espectros para o tempo de retenção 9,4 minutos. ....	54

---

<b>Figura 18</b> – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação do gene 16S do isolado S118E: 1 - marcador molecular 1Kb Plus, 2 a 6 - S118E, em diferentes tubos de reação; 7 – controlo negativo. ....	56
<b>Figura 19</b> - Resultados de homologia da sequência consensus do gene 16S do isolado S118E obtidos pelo programa de Blast (retirado de NCBI, acessido a 29 de outubro de 2023).....	56
<b>Figura 20</b> - Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA do isolado S118E extraído pelo Kit Miniprep. 1 - marcador molecular 1Kb Plus; 2 - amostra 1 (primeira eluição) 3 - amostra 2 (primeira eluição); 4 - amostra 1 (segunda eluição); 5 - amostra 2 (segunda eluição). ....	57
<b>Figura 21</b> - Distribuição dos Go terms por níveis: BP - processo biológico; MF - função molecular; CC - componente celular. ....	58
<b>Figura 22</b> - Distribuição de códigos enzimáticos: 1 – oxidoredutases; 2 – transferases; 3 – hidrolases; 4 – liases; 5 – isomerases; 6 – ligases; 7 – translocases.....	59
<b>Figura 23</b> – A – Modificação pós-tradução da plantazolicina, neste caso a desmetilação da arginina do N-terminal realçado a verde (in Lee et al. (2013); B - Estrutura molecular da plantazolicina com fórmula molecular $C_{63}H_{69}N_{17}O_{13}S_2$ e a massa molecular média de 1336,458 Da (retirado do ChemSpider, acessido a 15 de setembro de 2023). ....	61
<b>Figura 24</b> – Cluster de genes presente da região 5 do contig 1 com 91% de similaridade com o cluster produtor de plantazolicina pelo organismo <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061. Em destaque o gene <i>ctg1_1111</i> associado à produção de pznC. Os detalhes do gene encontram-se no canto superior direito (retirado de antiSMASH, acessido a 24 de outubro de 2023). ....	62
<b>Figura 25</b> - Ilustração dos clusters de genes biosintéticos para a plantazolina (in Molohon et al., 2011). A – organização genética dos clusters da plantazolicina. B – precursor peptídico da plantazolicina. Bam: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42; Bpum: <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061; Cms: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Sepedonicus</i> ; Cur: <i>Corvnebacterium urealyticum</i> DSM 7109; Blin: <i>Brevibacterium linens</i> BL2.....	63
<b>Figura 26</b> - Comparação entre o cluster obtido (Query sequence) e o cluster de <i>Bacillus pumilus</i> com 91% de similaridade (retirado de antiSMASH, acessido a 29 de outubro de 2023).....	63
<b>Figura 27</b> - Blast entre a sequências de nucleótidos do contig 1 (Query) e a sequência de nucleótidos do gene <i>pznA</i> do <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 (Sbjct) (retirado de NCBI, acessido a 29 de outubro de 2023). ....	64
<b>Figura 28</b> – Localização detalhada da sequência com 100% de identidade com a sequência do gene <i>pznA</i> do <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 simbolizada com a seta vermelha (retirado de antiSMASH, acessido a 29 de outubro de 2023).....	64
<b>Figura 29</b> - Via metabólica para o cluster com 91% de similaridade, 1,38 score de similaridade para o cluster produtor de plantazolicina em <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 (Retirado de antiSMASH, acessido a 6 de outubro de 2023).....	D

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação das bacteriocinas produzidas por <i>Bacillus</i> . Adaptado de Basi-Chipalu et al. (2022). .....	8
<b>Tabela 2</b> – Temperaturas e períodos de incubação do teste de estabilidade térmica. ....	19
<b>Tabela 3</b> - Enzimas utilizadas no ensaio de sensibilidade térmica, quantidade de enzima e amostra por ensaio e condições de incubação. ....	20
<b>Tabela 4</b> - Condições de amplificação do gene 16S utilizando os primers 8F e 1492R. ....	25
<b>Tabela 5</b> - Resultados do screening do teste de co-inoculação nas bactérias alvo: <i>M. luteus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . (-) sem atividade; (+) atividade entre 1-5mm; (++) atividade entre 5-10mm e (+++) atividade entre 10-20mm. ....	29
<b>Tabela 6</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para os batches 2, 3 e 4 resultantes do inóculo de beads em 100mL de meio LB. Controlo da atividade com uma alíquota do batch 3 da produção em 50mL LB e uma alíquota de ampicilina a 50µg/mL: (X) – poço não usado. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	37
<b>Tabela 7</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para os batches de 0 a 5 resultantes do inóculo de beads em 100mL pela segunda vez em meio LB. Controlo com uma alíquota de ampicilina a 50µg/mL. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	38
<b>Tabela 8</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para as frações resultantes dos processos de fracionamento: Prec – Precipitado, Sob. – Sobrenadante, Sob. Acetona otim. – Sobrenadante da precipitação com acetona otimizado concentrado em 50 vezes, Sob Concentrado 10x – sobrenadante concentrado em 10 vezes. Controlo com uma alíquota do batch 3. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	39
<b>Tabela 9</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para ensaio de estabilidade térmica: Sob. 10x – sobrenadante concentrado em 10 vezes. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.....	41
<b>Tabela 10</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para o teste de estabilidade térmica com a exposição do eluído na proporção de 200:800 ao longo do tempo a diferentes temperaturas. A região superior da tabela segue as diluições superiores e a região inferior da tabela segue as diluições inferiores. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	42
<b>Tabela 11</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para o ensaio de sensibilidade à ação enzimática: C. – Controlo, PK – Proteinase K, S – Subtilisina, T – tripsina, 1, 2 e 5 – representa a concentração utilizada de cada enzima ou de tampão nos controlos. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. O rosa indica as reações com proteinase K e controlos. O verde indica a reação com subtilisina A e controlo. O	

azul indica as reações com tripsina e controlos. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	44
<b>Tabela 12</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para as frações assinalados na primeira cromatografia de gel: F- fração, Sob. Acetona otim. - Sobrenadante da precipitação com acetona otimizado concentrado em 50 vezes. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.....	46
<b>Tabela 13</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para o grupo de frações D, sobrenadante e precipitado: Sob. - Sobrenadante da centrifugação. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	48
<b>Tabela 14</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para os compostos resultantes da cromatografia de fase reversa com recurso as Spin Columns: A.C. – recolha do produto após carregar a amostra na coluna; C. 50x – controlo (sobrenadante 50 vezes concentrado); eluído - eluído com acetona a 100% e 1, 2 e 3 - número de lavagens da coluna. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	49
<b>Tabela 15</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para os compostos resultantes da cromatografia de fase reversa com a coluna de 1mL de resina C18 compactada: A.C. – recolha do produto após carregar a amostra na coluna; C. 50x – controlo (sobrenadante 50 vezes concentrado); eluído único 100% - eluído com acetona a 100% de uma só vez (primeira situação); E. – Eluído com dada percentagem de acetona (segunda situação); 1 e 2 - número de lavagens da coluna (primeira situação). O rosa indica para os produtos da primeira situação. O azul indica para os produtos da segunda situação. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.....	49
<b>Tabela 16</b> - Avaliação da atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> pelo método de diluição em meio líquido para os grupos de frações da 1ª cromatografia da amostra 30% C18 (indicado a rosa) e para a 2ª cromatografia da amostra 60% C18 (indicado a azul): 30% C18 e pellet 30% C18– amostra e pellet da amostra eluída com 30% de acetona da coluna C18; 60% C18 e pellet 60% C18 – amostra e pellet da amostra eluída com 60% de acetona da coluna C18; A/B/C/D/E 30 – 5 grupos de frações da 1ª cromatografia da amostra 30% C18; A/B/C/D/E 60 – 5 grupos de frações da 2ª cromatografia da amostra 60% C18. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano. ....	52
<b>Tabela 17</b> - Tabela de purificação do composto com atividade antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> recuperado do sobrenadante de cultura. ....	53
<b>Tabela 18</b> - Resultados da pesquisa no sítio antiSMASH: LAP - linear azol(in)e-containing peptides; NRPS - non-ribosomal peptide synthetase; Other - cluster containing a secondary metabolite-related protein that does not fit into any other category; RiPP-like - other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (acedido a 6 de outubro de 2023). ....	60
<b>Tabela 19</b> - Caracterização dos meios de cultura utilizados.....	B

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível com a ajuda, colaboração e apoio de várias pessoas e entidades, às quais gostaria de demonstrar o meu agradecimento.

- À Universidade dos Açores e ao Centro de Biotecnologia dos Açores que possibilitaram a execução deste trabalho através da disponibilização das instalações, materiais e equipamentos necessários.
- Aos colegas e colaboradores do CBA pelo apoio ao longo de todo o processo.
- À Professora Doutora Carla Cabral, orientadora deste trabalho, um agradecimento especial, pela disponibilidade constante, todo o conhecimento e conselhos transmitidos ao longo de todas as fases deste trabalho.
- Ao Doutor Duarte Toubarro, orientador deste trabalho, agradeço o apoio e o conhecimento transmitido.
- Ao Professor Doutor Nelson Simões, orientador deste trabalho, pelo apoio demonstrado e, especialmente, pela escolha do tema do projeto.
- Aos meus pais, irmão e à minha segunda família pelo suporte e carinho demonstrado.
- Ao meu amigo e namorado, David, quero agradecer toda a ajuda, apoio, amizade e ternura proporcionados ao longo deste ano. Obrigada.

## RESUMO

As bactérias produzem péptidos antimicrobianos que apresentam atividade sobre vários organismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bacteriocinas são péptidos antimicrobianos de baixo peso molecular sintetizados por via ribossômica, apresentando diversas aplicações, como a produção de novos fármacos. Algumas bacteriocinas produzidas por *Bacillus* demonstram atividade contra patógenos multirresistentes, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Este trabalho teve como objetivo a identificação de compostos antimicrobianos produzidos a partir de *Bacillus* isolados do solo dos Açores com ação contra *Staphylococcus*.

De 20 isolados iniciais, pelo método de co-inoculação com *M. luteus*, *S. aureus* e *E. coli*, foram escolhidos 7 isolados que apresentavam elevada atividade antimicrobiana. Procedeu-se à cultura em meio líquido destes 7 isolados, selecionando dois (S117B e S118E) que apresentavam atividade apenas sobre *M. luteus*. Otimizou-se a produção de AMP's em meio líquido através da imobilização das células produtoras em esferas de agar. Deste processo resultou a recuperação da atividade contra *S. aureus*, e o aumento de atividade antimicrobiana, contra *M. luteus*, que tinha sido perdida quando as células foram transferidas do crescimento em meio sólido para o meio líquido. Foi selecionado o isolado S118E por apresentar mais atividade antimicrobiana, especialmente, contra *S. aureus*. Utilizando a mesma técnica de imobilização, aumentou-se a produção de sobrenadante. Através da degradação com 5mg/mL de proteinase K e da inativação pelo aumento da temperatura, concluiu-se que o composto ativo apresentava natureza proteica. Baseados nesta informação orientámos o processo de separação para pequenas moléculas de natureza proteica. O sobrenadante das culturas foi recolhido, filtrado e testado em todas as etapas, inicialmente, pelo método de difusão em agar e, posteriormente, substituído pelo método de diluição em meio líquido.

O sobrenadante foi concentrado e fracionado tanto por *Centricon*, como por processos de precipitação, utilizando sais e solventes orgânicos. O sobrenadante do processo de precipitação com acetona otimizado foi fracionado através da coluna *Superdex peptide 10/300 GL*, coluna de fase reversa com resina C18 e coluna de fase reversa RPC por FPLC. A atividade foi recolhida da coluna *Superdex* entre os 21 e 22 minutos, indicando para moléculas menores que 5kDa. A atividade antimicrobiana foi, também, eluída com 30% e 60% de acetona na coluna C18 e eluída por volta dos 60% de acetona da coluna RPC. Foi atingida a maior purificação com 220 *fold* de

purificação e 20% de recuperação na amostra 60% C18. Verificou-se que a atividade não era detetável à absorvância de 280nm. Ambas as frações analisadas por MALDI-TOF MS estão enriquecidas em péptidos com peso molecular entre 700 e 1024 Da. A análise do gene 16S identificou o isolado S118E como *Bacillus pumilus*, posteriormente, confirmado pela análise do genoma com 3,6Mbp. Da mineração genómica resultaram 4 *clusters* de genes com 78%, 80%, 85% e 91% de similaridade com cluster produtores de lichenisina, bacilibactina, bacilisina e plantazolicina, respetivamente. Confirmou-se a presença do gene *pznA* que sintetiza para o péptido precursor da plantazolicina e para o gene *pznC* que sintetiza enzimas modificadoras deste péptido.

Este trabalho permitiu identificar bacteriocinas produzidas por *Bacillus pumilus* S118E com ação contra *Staphylococcus aureus* sendo necessário mais testes para confirmar a sua atividade anti-MRSA.

**Palavras-chave:** *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, Péptidos antimicrobianos (AMP), Bacteriocinas, Açores.

## ABSTRACT

Bacteria produce antimicrobial peptides that exhibit activity on various organisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria. Bacteriocins are low molecular weight antimicrobial peptides synthesized ribosomally, with diverse applications, such as the production of new drugs. Some bacteriocins produced by *Bacillus* demonstrate activity against multidrug-resistant pathogens, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

This work aimed to identify antimicrobial compounds produced from *Bacillus* isolated from the soil of the Azores against *Staphylococcus*.

From 20 initial isolates, using the co-inoculation with *M. luteus*, *S. aureus* and *E. coli*, 7 isolates were chosen that showed high antimicrobial activity. These 7 isolates were cultured in liquid medium, selecting two (S117B and S118E) that showed activity only against *M. luteus*. The production of AMPs in liquid media was optimized by immobilizing the producing cells on agar beads. This process resulted in recovery of activity against *S. aureus* and increased antimicrobial activity against *M. luteus*, which had been lost when the cells were transferred from growth in solid medium to liquid medium. Isolate S118E was selected as it presented more antimicrobial activity, especially against *S. aureus*. Using the same immobilization technique, the production of supernatant was increased. Through degradation with 5mg/mL of proteinase K and inactivation under increased temperature, it was concluded that the active compound had a proteinaceous nature. Based on this information, we guided the separation process towards small molecules of a protein nature. The culture supernatant was collected, filtered, and tested at all stages, initially by the agar diffusion method and, later, replaced by the liquid medium dilution method.

The supernatant was concentrated and fractionated both by Centricon and by precipitation processes, using salts and organic solvents. The supernatant from the optimized acetone precipitation process was fractionated through the Superdex peptide 10/300 GL column, C18 resin reversed phase column and RPC reversed phase column by FPLC. Activity was collected from the Superdex column between 21 and 22 minutes, indicating molecules smaller than 5kDa. The antimicrobial activity was also eluted with 30% and 60% acetone on the C18 column and eluted around 60% acetone on the RPC column. The highest purification was achieved with 220 purification-fold and 20% recovery in sample 60% C18. It was found that the activity was not detectable at absorbance of 280nm. Both fractions analyzed by MALDI-TOF MS are enriched in

peptides with molecular weight between 700 and 1024 Da. Analysis of the 16S gene identified isolate S118E as *Bacillus pumilus*, later confirmed by genome analysis with 3.6Mbp. Genomic mining resulted in 4 gene clusters with 78%, 80%, 85% and 91% similarity with clusters producing lichenisin, bacilibactin, bacillysin and plantazolicin, respectively. The presence of the *pznA* gene that synthesizes the plantazolicin precursor peptide and the *pznC* gene that synthesizes enzymes that modify this peptide was confirmed.

In this work was possible to identify bacteriocins produced by *Bacillus pumilus* S118E against *Staphylococcus aureus*, requiring further tests to confirm their anti-MRSA activity.

**Keywords:** *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, Antimicrobial peptides (AMP), Bacteriocins, Azores.

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a multirresistência antimicrobiana compreende uma ameaça global reconhecida por várias organizações como a OMS, a Comissão Europeia, Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CCPD), Administração de Alimentos e Drogas dos EUA e pelo Departamento da Agricultura dos EUA. Esta problemática resulta, principalmente, do consumo contínuo de antibióticos (Alqahtani *et al.* 2023). Os patógenos resistentes a drogas ameaçam tanto a saúde como a economia. De facto, o CCPD estima que 70% das bactérias que causam infeções nosocomiais são resistentes a pelo menos 1 antibiótico normalmente usado no combate a estas infeções. Além disso, estima-se que as infeções multirresistentes causam mais de 700.000 mortes por ano e com a ausência de medidas de mitigação, prevê-se que até 2050 seja capaz de causar cerca de 10 milhões de mortes e provocar prejuízos na ordem dos 95 triliões de euros por ano (Liang & Diana, 2022; Liu *et al.*, 2022; Saggese *et al.*, 2022).

De modo a combater isto, foi desenvolvido um Plano de Ação no Combate a Bactéria Resistentes a Antibióticos pelos EUA a nível nacional, de modo a desenvolver estratégias no combate a infeções provenientes destas bactérias. A *One Health* reconhece a interligação entre humanos, plantas, animais e o ambiente e o respetivo impacto que cada um destes pode causar sobre os restantes. Também, reconhece a transmissão direta de genes de resistência a AMP's entre humanos e animais, quer pelo consumo destes e de plantas, quer pelo contacto direto de humanos com animais, ou pelo contacto indireto, através da poluição das quintas ou contacto com os hospedeiros (Chung *et al.*, 2023). Assim, implementaram-se restrições no uso de glicopéptidos, fluoroquinolonas e cefalosporinas na saúde humana e na saúde animal (Chung *et al.*, 2023; Liang & Diana, 2022).

Com base no mencionado, mostra-se urgente a identificação de novas estratégias no combate ao aumento da resistência dos patógenos. As vacinas e os probióticos foram considerados como alternativas aos antibióticos, contudo, um composto que se demonstra promissor e que, inclusive, já é utilizado em certos casos, são os péptidos antimicrobianos, designados de AMP's (Saggese *et al.*, 2022). Efetivamente, estes são candidatos terapêuticos de interesse pelo seu abrangente espectro de ação sobre bactérias, fungos, protozoa, parasitas e vírus (Liang & Diana, 2022).

A OMS declarou 12 patógenos considerados como mais ameaçadores à vida humana e que são prioritários na pesquisa de novos compostos antibióticos. Nestes, encontra-se o

*Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) com prioridade de nível dois ou alta e que, segundo a OMS, é responsável por 64% mais mortalidade, comparativamente às outras infecções não resistentes (Abriouel *et al.*, 2010; Liang & Diana, 2022; Liu *et al.*, 2022). Além disso, é também, responsável por 10 vezes mais infecções que todos os patógenos multirresistentes gram-negativos (Liu *et al.*, 2022).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria comensal da flora da pele e nasal em humanos saudáveis. Também, pode ser um patógeno oportunista que causa infecções na pele, tecidos moles, bacteremia, osteomielite, artrite séptica, pneumonia, endocardite, entre outras. *S. aureus* é altamente adaptativo, versátil e formador de biofilmes que os protege do sistema imune. No caso do MRSA, este adquiriu por transferência horizontal o gene *mecA* que confere resistência a antibióticos (Liu *et al.*, 2022).

Na pesquisa de novos compostos anti-MRSA são utilizados *screening* de culturas e, recentemente, embora pouco explorada, a mineração genómica, utilizando as bases de dados disponíveis (Aunpad *et al.*, 2007; Liang & Diana, 2022; Liu *et al.*, 2022). Já foram descritos exemplos de AMP's e bacteriocinas produzidas por uma variedade de organismos com ação anti-MRSA, como por exemplo a antinomicesina produzida por *Actinomyces riminicola* com ação *in vivo* em ratos infetados com MRSA (Alqahtani *et al.* 2023; Darbandi *et al.*, 2021; Liang & Diana, 2022; Liu *et al.*, 2022).

Quase todos os organismos do domínio da vida, desde microrganismos, plantas, invertebrados até aos anfíbios mais complexos e mamíferos, são capazes de produzir metabolitos secundários, conservados em termos evolutivos (Liang & Diana, 2022 ; Saggese *et al.*, 2022). Estes compostos são conhecidos como péptidos antimicrobianos (AMP) (Abriouel *et al.*, 2011; Mussa *et al.*, 2020). Os AMP's são uma grande classe de pequenos péptidos contendo de 12 a 100 aminoácidos que apresentam, na maior parte dos casos, carga positiva e propriedades anfipáticas (Liang & Diana, 2022; Singh *et al.*, 2023). No caso dos animais vertebrados, os AMP's são designados de defensinas e catelicidinas (Saggese *et al.*, 2022).

Até à data da elaboração da presente dissertação, são conhecidos mais de 3.000 AMP com grande diversidade química e são isolados a partir de vários organismos (Saggese *et al.*, 2022). Os AMP's são classificados, maioritariamente, tendo em conta a estrutura das moléculas e os mecanismos de biossíntese destas. Estes péptidos podem ser sintetizados por via ribossomal (RiPP) ou por via não ribossomal (NRPS). A polimixina e a uterina são exemplos de péptidos sintetizados por via não ribossómica e as bacteriocinas são um exemplo de péptidos sintetizados por via ribossomal de origem bacteriana e estes podem sofrer modificações pós-tradução e/ou

outros processos proteolíticos (Liu *et al.*, 2022). Estas modificações podem ser essenciais, por exemplo, na ativação de péptidos precursores sintetizados na sua forma inativa. Atribuiu-se o termo de BLIS quando a origem de síntese de AMP's é desconhecida. (Abriouel *et al.*, 2011; Mussa *et al.*, 2020).

Os AMP apresentam diversas funções, tendo um papel fundamental na imunidade inata e na proteção contra a competição dos organismos produtores (Liang & Diana, 2022; Saggese *et al.*, 2022). Para os microrganismos, os AMP's são considerados como a primeira linha de defesa. Este péptidos demonstram atividade antimicrobiana sob largo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que, geralmente, demonstram mais atividade sobre as Gram-positivas (Liu *et al.*, 2022). Os AMP's são capazes de atuar, também, sobre fungos, vírus e outros parasitas (Saggese *et al.*, 2022).

Tal como já foi referido, no caso dos vertebrados, os AMP's são designados de defensinas e catelicidinas que, para além da ação antimicrobiana, induzem o processo de quimiotaxia e apresentam funções imunomoduladoras tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida, como por exemplo, induzem o processo de quimiotaxia de células imunes (Liang & Diana, 2022; Saggese *et al.*, 2022).

O género *Bacillus* compreende 377 espécies e podem ser encontrados em diversos ambientes: aquático, solo, alimento, microbioma intestinal de mamíferos e artrópodes, entre outros. É um táxon fenotipicamente e filogeneticamente muito diversificado. As bactérias deste género são conhecidas por serem Gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas facultativas, pelo seu formato de bastonete e formadoras de esporos. Estas podem se encontrar na sua forma singular ou agrupada, por vezes, em formato de cadeia ou em longos filamentos (Alqahtani *et al.* 2023; Kuwana *et al.* 2022).

Os *Bacillus* são os mais conhecidos pela produção de péptidos antimicrobianos de diferentes estruturas químicas com diversas aplicações e atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antitumorais, antiamebas e antimicoplasmas (Basi-Chipalu *et al.*, 2022; Danilova *et al.*, 2023). No caso de *B. subtilis*, 4 a 5% do genoma é dedicado à síntese de AMP's, demonstrando estes 24 estruturas diferentes (Danilova *et al.*, 2023). Os péptidos antimicrobianos podem ser lineares, ciclilipopéptidos e tiopéptidos. Dentro péptidos, os mais conhecidos deste género são os ciclilipopéptidos de três categorias estruturais: as surfactins, iturinas e as fengicinas (Saggese *et al.*, 2022). De modo geral, os produtos antimicrobianos de *Bacillus* são resistentes à degradação enzimática e à ação da temperatura (Alqahtani *et al.* 2023). As bactérias e os fungos,

particularmente, são os alvos de mais estudo na pesquisa de novos compostos. No caso das bactérias, são afetadas tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Saggese *et al.*, 2022).

A título de exemplo, quanto à espécie de *Bacillus* mais estudada para a produção de AMP's, nota-se que diferentes estirpes de *B. subtilis* são capazes de produzir diferentes tipos de bacteriocinas, tais como subtilina, ericina A e S, sublancina 168, mersacidina, entre outros (Saggese *et al.*, 2022). Adicionalmente, *B. sonorensis* produz o péptido sonorensis com ação contra *B. subtilis*, bem como *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio vulnificus* (Basi-Chipalu *et al.*, 2022). Também, são conhecidos thyrocidin e gramicidina D que são pequenos péptidos produzidos por *Brevibacillus brevis*, a bacitracina A por *B. licheniformis* e a bacilisina por *B. subtilis*, *B. amyloloquefaciens* e por *B. pumilus* (Alqahtani *et al.* 2023; Danilova *et al.*, 2023; Mussa *et al.*, 2020).

Relativamente à espécie *Bacillus pumilus*, esta pode ser alvo de AMP's, como também pode ser a própria produtora, a título de exemplo, da bacilisina que é um péptido sintetizado por via não ribossômica (Danilova *et al.*, 2023). Outro caso é a pumilacidina, um péptido de síntese não ribossomal, com 7 aminoácidos (aa) de comprimento, apresentando ação sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Saggese *et al.*, 2022).

Verifica-se que vários processos fisiológicos como esporulação, produção de biofilmes, desenvolvimento celular, síntese de enzimas proteolíticas e produção de AMP em *Bacillus* são controlados por mecanismos de *quorum-sensing*. A presença ou a ausência de certos fatores externos faz inibir ou ativar a expressão dos genes associados à síntese dos AMP's. A presença dos próprios péptidos antimicrobianos, como o caso da bacilisina e da bacitracina, podem atuar como moléculas sinal deste mecanismo (Danilova *et al.*, 2023).

As bacteriocinas apresentam diversas propriedades que as tornam favoráveis em vários usos. Nomeadamente, apresentam um estreito e eficaz espectro de ação contra o parasita em causa; baixa toxicidade para o hospedeiro; distintos modos de ação; por norma, elevada estabilidade ao pH e à temperatura e facilidade de alteração estrutural através da bioengenharia. Também, apresentam ação antimicrobiana sobre vários patógenos por via alimentar, como é o caso de *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, entre outros, e contra patógenos multirresistentes (Karagiota *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Por exemplo, são conhecidos casos de utilização de AMP's de vertebrados na aplicação tópica e no tratamento de infeções nos pulmões, cavidade oral e na pele (Liang & Diana, 2022).

O género *Bacillus* produz bacteriocinas que apresentam vastas utilidades, como se observa pela Figura 1. Estas bactérias apresentam características valorizadas pelas indústrias, tais como:

segurança, rápida produção, facilidade do manuseamento em ambiente laboratorial, poucas exigências nutricionais, ciclos curtos de fermentação e elevada capacidade em secretar proteínas para o meio extracelular (Basi-Chipalu *et al.*, 2022; Berić *et al.*, 2014; Mercado *et al.*, 2022).

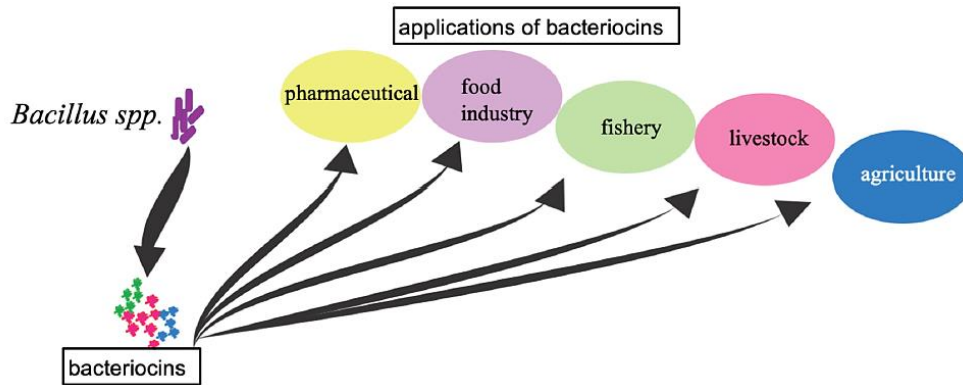


Figura 1 - Aplicações das bacteriocinas produzidas por *Bacillus* spp. em diferentes setores (in Basi-Chipalu *et al.*, 2021).

No setor farmacêutico, várias espécies de *Bacillus* produzem compostos antimicrobianos de interesse, nomeadamente, no tratamento de infeções e na produção de suplementos. No caso do tratamento de infeções, estes são considerados alternativas viáveis aos antibióticos convencionais, uma vez que se verifica, cada vez mais, o desenvolvimento de resistências contra estes antibióticos. As bacteriocinas atuam sobre diversos organismos, como mencionado anteriormente, desde fungos a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, nas quais incluem-se as bactérias patogénicas de humanos e animais (Abriouel *et al.*, 2010; Mussa *et al.*, 2020). A título de exemplo, BLIS produzidos por *Bacillus* demonstraram-se eficientes na inibição de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e a *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Para além disto, a bacitracina é um caso de um lantibiótico usado clinicamente em combinação com outros compostos antimicrobianos. A sua toma diária de 7 a 10 dias demonstrou efeito no tratamento de sintomas causados por *Clostridium difficile*. Ainda, a bacitracina apresenta ação sobre *S. puogenes* e *S. aureus* (Danilova *et al.*, 2023). Em termos de produção de suplementos, destacam-se as seguintes bactérias: *B. cereus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis* e *B. subtilis* (Abriouel *et al.*, 2010; Alqahtani *et al.*, 2023). Os produtos destes são usados como probióticos para humanos e para animais (Basi-Chipalu *et al.*, 2022).

No setor alimentar, as bacteriocinas são uma escolha promissora para a substituição natural dos preservantes químicos, normalmente, utilizados. As suas propriedades, como a estabilidade

à temperatura e ao pH, permitem que, após efetuarem o seu propósito como preservantes, sejam degradadas pelas proteases do sistema digestivo sem causarem efeitos tóxicos, tais como disbiose intestinal (Abriouel *et al.*, 2010; El-Sharoud *et al.*, 2022). De facto, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) já aprovaram a bacteriocina nisina produzida por *Paenibacillus polymyxa* como preservante alimentar em aproximadamente, 50 países (El-Sharoud *et al.*, 2022).

Em aquacultura, os probióticos produzidos por *Bacillus*, como por exemplo *B. licheniformis* e *B. paralicheniformis*, podem ser usados na preservação do peixe, melhorando o processo de armazenamento e industrialização de peixes, como pode ainda melhorar a saúde dos peixes de aquacultura (Alqahtani *et al.* 2023). Em um dos casos, foram isolados *Bacillus* do microbioma intestinal de peixes e pesquisou-se bacteriocinas com capacidades promissoras no tratamento de infeções em peixes. Nesta pesquisa, foi descoberta a bacteriocina TSU4 isolada do peixe *Catla catla*. Ainda nesta área, também, a nisina é utilizada como preservante, neste caso de embalagens a vácuo de truta arco-íris, sendo capaz de aumentar a preservação a 4°C de 12 dias para 16 dias (Basi-Chipalu *et al.*, 2022).

Na pecuária, como mencionado anteriormente, as bacteriocinas produzidas por *Bacillus* podem ser usadas como probióticos. Estas, têm capacidade para melhorar a saúde animal, como demonstra a lichenin com efeito antimicrobiano contra *Eubacterium ruminantium* e *Streptococcus bovis*. As doenças causadas em animais por vezes carregam zoonoses, sendo assim, estes probióticos contribuem para o controlo de infeções posteriores em humanos (Basi-Chipalu *et al.*, 2022).

Por fim, na agricultura e no ambiente, também, as bacteriocinas de *Bacillus* demonstram-se importantes. Os *Bacillus* são encontrados em diversos ambientes e tanto o solo como as plantas não são exceção (Alqahtani *et al.*, 2023; Danilova *et al.*, 2023). Os mecanismos de interação desenvolvidos ao longo da evolução entre estas bactérias e as plantas são um fator que proporciona a pesquisa e a utilização destes péptidos na agricultura. Estas rizobactérias são capazes de sobreviver sob as condições adversas do ambiente, logo produzem compostos que suportam as mesmas condições. Estes compostos são, por sua vez, utilizados por parte das plantas, estimulando o seu crescimento e prevenindo infestações e, assim, possíveis doenças (Danilova *et al.*, 2023). A título de exemplo, a ericina S apresenta atividade antimicrobiana sobre *Clavibacter michiganensis*, bactéria responsável pela corrosão bacteriana no tomate. Ainda, o lipopéptido surfactina demonstrou atividade antitumoral, antiviral e antibacteriano em plantas, podendo ser aplicado como biorremediador. Também, o lipopéptido do tipo fengicina produzido

por *B. subtilis* apresenta ação sobre *Rhizoctonia solani*, que causa doenças na planta do algodão (Alqahtani *et al.* 2023; Basi-Chipalu *et al.*, 2022).

O modo de ação dos AMP's pode ser dividido de duas grandes formas: morte direta do microrganismo alvo ou regulação imunológica. Em termos de ação de defesa, o mecanismo de ação pode envolver o ataque sobre a membrana celular, provocando a lise celular e a posterior morte. Como pode, também, atravessar sobre a membrana e inibir funções intracelulares críticas, como a sua união ao DNA, RNA ou a outras proteínas envolvidas nos processos intracelulares. Pela ação direta sobre a membrana, os AMP's são capazes de interferir nas interações hidrofóbicas entre os componentes fosfolipídicos, na despolarização, disrupção ou formação de poros na membrana, entre outros casos (Karagiota *et al.*, 2021; Liang & Diana, 2022; Mercado *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023).

Para além disso, o modo de ação pode ser bactericida ou bacteriostático, em que o primeiro caso leva a morte celular quando exposto ao composto e o segundo caso leva à diminuição ou à estagnação da divisão celular. No entanto, o mesmo composto pode apresentar ambos os modos de ação sobre a mesma bactéria, quando presente em diferentes concentrações, mais concretamente, a baixas concentrações pode apresentar efeito bacteriostático e a altas concentrações apresentar efeito bactericida (Aunpad *et al.*, 2007). Os AMP's produzidos por *Bacillus* não são exceção. Estes são conhecidos por alterar a parede celulares das Gram-positivas e desorganizar a membrana exterior das Gram-negativas, alterando a sua estrutura e produzindo lise celular (Mercado & Olmos, 2022).

A síntese de AMP's em *Bacillus* é concretizada, principalmente, através de duas formas: síntese não ribossomal de péptidos e a síntese ribossomal de precursores de péptidos, que são sujeitos, por sua vez, a modificações pós-tradução (Mussa *et al.*, 2020; Saggese *et al.*, 2022).

Sobre os péptidos sintetizados por via ribossômica, mais concretamente bacteriocinas, vários autores classificaram-nas de distintos modos. A primeira classificação foi executada por Klaenhammer em 1993, seguindo Nes *et al.* em 2007 e depois por Abriouel *et al.* em 2011. A mais recente reclassificação cabe a Soltani *et al.* em 2021. Nesta, as bacteriocinas encontram-se divididas em três grandes grupos, classe I, classe II e classe III. As classes I e II encontram-se subdivididas em quatro e três subclasses, respetivamente. A classificação tem por base as diferenças de peso molecular dos péptidos produzidos (Tabela 1) (Basi-Chipalu *et al.*, 2022).

**Tabela 1** – Classificação das bacteriocinas produzidas por *Bacillus*. Adaptado de Basi-Chipalu et al. (2022).

Classe	Subclasse
<b>Classe I</b> Péptidos com <5kDa Possuam modificações pós-traducionais	<b>I.1</b> Lantibióticos de péptido único Ex: Subtilina, Ericina A e S ( <i>B. subtilis</i> )
	<b>I.2</b> Outros lantibióticos de péptido único Ex: Mersacidina ( <i>Bacillus sp.</i> ) e Sublancina 168 ( <i>B. subtilis</i> )
	<b>I.3</b> Lantibióticos de dois péptidos Ex: Haloduracina ( <i>B. halodurans</i> ) e lichenicidina ( <i>B. licheniformis</i> )
	<b>I.4</b> Conformações únicas
<b>Classe II</b> Péptidos com 6-10 kDa Sem modificações Péptidos com pontes de dissulfureto instáveis.	<b>II.a</b> Pediocin-like
	<b>II.b</b> Compostos de dois péptidos
	<b>II.c</b> Péptidos ativos por thiol
<b>Classe III</b> Proteínas de grandes dimensões (30kDa) Ex: Megacin A-216 e Megacin A-19213 ( <i>B. megaterium</i> )	

Deve-se referir, no entanto, que a maioria das bacteriocinas produzidas por *Bacillus* enquadram-se nas Classes I e II com baixo peso molecular (Aunpad *et al.*, 2007). Ainda dentro destas, grande parte encontra-se na classe I, ou seja, péptidos antimicrobianos com tamanho inferior a 5kDa e com modificações pós-tradução. Estes péptidos são os mais bem caracterizados a nível estrutural, determinantes genéticos e em termos de mecanismos de biossíntese (Abriouel *et al.*, 2010).

Para além das bacteriocinas modificadas, este género também produz outras bacteriocinas não modificadas, constituindo a classe II, algumas bacteriocinas pediocin-like, proveniente de bactérias lácticas, péptidos desconhecidos com origem em novas sequências, entre outros casos.

Esta elevada variedade sugere a transferência de genes horizontais entre as espécies (Abriouel *et al.*, 2010).

O género *Bacillus* apresenta, também, alguns AMP's e bacteriocinas com ação anti-MRSA. Em primeiro lugar, destaca-se a bacteriocina BAC-IB17 produzida por *B. subtilis* com possíveis aplicações farmacêuticas, na indústria alimentar e capaz de suportar condições ambientais adversas (Ansari *et al.*, 2018). Seguidamente, refere-se o exemplo da pumilacidina, um lipopéptido de síntese não ribossomal (NRPS) produzido por *Bacillus pumilus* com ação anti-MRSA e até contra *Listeria monocytogenes* (Aunpad *et al.*, 2007; Saggese *et al.*, 2022).

Através deste enquadramento, fica patente a elevada importância da pesquisa de novos compostos antimicrobianos para contribuir no combate contra bactérias multirresistentes. Assim, a presente dissertação enquadra-se na pesquisa de AMP's sintetizados pelo género *Bacillus* com atividade antimicrobiana sobre cocos Gram-positivos, principalmente, contra o género *Staphylococcus*.

Tendo em conta a variedade de compostos antimicrobianos produzidos pelo género *Bacillus*, este trabalho pretende identificar e caracterizar compostos antimicrobianos produzidos a partir de *Bacillus* isolados do solo dos Açores, que integram a Coleção de *Bacillus* da Universidade dos Açores, pertencente ao Centro de Biotecnologia dos Açores (CBA).

Para concretizar isto, os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- Selecionar isolados que demonstram elevada atividade antimicrobiana pelo teste de co-inoculação com *M. luteus*, *S. aureus* e *E. coli*;
- Otimizar a produção de AMP's de 2 isolados através da imobilização em esferas de agar colocadas em meio líquido;
- Aumentar a produção de sobrenadante com atividade antimicrobiana com a imobilização das células de 1 isolado;
- Caracterizar a natureza proteica da atividade antimicrobiana;
- Fracionar, purificar e determinar a massa intacta da bacteriocina com mais atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus*;
- Extrair e sequenciar DNA do isolado escolhido;
- Analisar os resultados de proteómica e de genética do isolado de interesse através de MALDI-TOF MS e da mineração genómica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultura de Bactérias e Condições de Crescimento

#### 2.1.1. Bactérias Produtoras

As bactérias alvo do estudo da pesquisa de péptidos antimicrobianos são as bactérias do género *Bacillus sp.* isolados de amostras de solo dos Açores que constam da Coleção de *Bacillus* da Universidade dos Açores pertencentes ao Centro de Biotecnologia dos Açores, CBA. Estas bactérias produtoras encontram-se preservadas em forma de esporos incorporados em papel de filtro estéril armazenados em *ependorfs* estéreis.

Foram escolhidos vinte isolados, tendo por base conhecimentos prévios disponíveis na base de dados da coleção, isolados estes que anteriormente manifestaram atividade antimicrobiana. Estes isolados foram os seguintes: S15D, S26D, S27A, S30D, S53C, S62B, S66A, S71E, S80E, S91B, S92B, S110D, S115B, S117B, S118E, S124A, S127E, S150C, S157B e S160A.

A recuperação destes isolados a partir dos esporos foi feita recorrendo a dois inóculos por bactéria em dois meios diferentes, nomeadamente em placas de Agar Nutritivo (AN) e em placas de meio T3 agarizado (Anexo I). Em ambos os casos, as bactérias foram analisadas ao microscópio contraste de fase (*Olympus BH2*) com o objetivo de confirmar as características típicas de *Bacillus*. Também, foi utilizando para confirmar a densidade de esporos produzidos para armazenamento. Os papéis de filtro com os esporos foram inseridos no topo de cada placa seguindo-se de um riscado pela restante.

Em termos de condições de crescimento, os *Bacillus* foram inoculados em placas de AN e T3 agarizado e, uma vez incubados a 38°C por 24 horas, foram mantidos a 4°C e repicados mensalmente em novas placas de AN e T3 agarizado.

#### 2.1.2. Bactérias Indicadoras

Com o fim de detetar e testar os compostos antimicrobianos resultante da cultura das bactérias produtoras, foram escolhidas três bactérias que pertencem ao CBA, estas que são as seguintes:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC <sup>1</sup>25923, usado em controlo de qualidade;
- *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn, DMS <sup>2</sup>20030, ATCC 4698, usado em controlo de qualidade;
- *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers, estirpe EMG 2: K (*lambda*), DMS 498, ATCC 23716.

Estas bactérias foram mantidas a 4°C em placas de AN e mensalmente repicadas em novas placas de AN, incubadas a 38°C a *E. coli* e *S. aureus* e a 28°C o *M. luteus* por um período de 24 horas e 48 horas respetivamente.

## 2.2. Detecção de Atividade Antimicrobiana nos Isolados

Para avaliar a capacidade dos vários *Bacillus* para a produção de compostos com atividades antibacterianas, foi executado um teste de co-inoculação de cada um dos isolados com as três bactérias indicadoras. O teste consistiu em inocular o isolado de *Bacillus* fazendo um riscado inicial do comprimento do diâmetro da placa de AN e incubar a 38°C por 16 horas. Após o crescimento do *Bacillus* em causa, foram inoculadas as bactérias indicadoras, usando como inóculo uma cultura de 24h em meio LB, a 30°C a 200rpm. Estes novos riscados de sentido único foram feitos transversalmente ao riscado inicial, iniciando-se na extremidade da placa dirigindo-se ao riscado central aproximando-os o máximo possível sem cruzarem-se um com o outro. Após realizar os novos riscados, as placas foram incubadas novamente a 38°C entre 16-24 horas.

O espectado é observar ou não uma inibição do crescimento das bactérias alvo e conseguir visualizar a distância em que, através do riscado produzido, o composto antimicrobiano consegue atingir. Quanto maior a distância do riscado com inibição do crescimento, mais interesse terá dada bactéria produtora no desenvolver do trabalho.

---

<sup>1</sup> American Type Culture Collection

<sup>2</sup> Coleção alemã de microrganismos do Instituto Leibniz

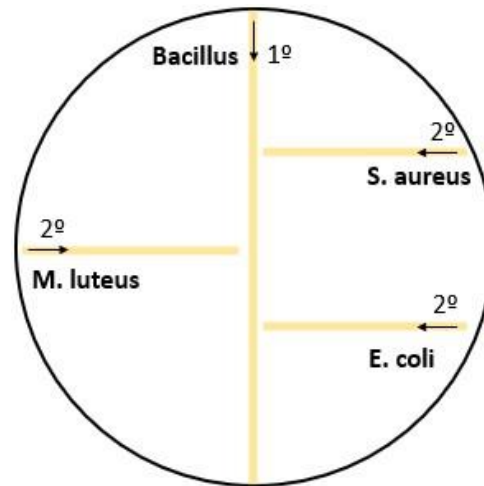


Figura 2 - Imagem ilustrativa dos riscados efetuados no teste de co-inoculação.

### 2.3. Obtenção das Moléculas Ativas em Cultura Líquida

Para este passo, foram selecionados sete isolados, estes que são: S53C, S117B, S118E, S124A, S150C, S157B e S160A.

Feita esta seleção, procedeu-se à produção inicial de cultura de cada um dos isolados em meio de cultura LB e BHI. Esta produção consistiu em, inicialmente, fazer dois pré-inóculos em tubos de ensaio de 5mL de meio LB e BHI para cada bactéria e, após 16 horas de incubação a 30°C e a 200rpm, faze-se um inóculo a 2% em 50mL de meio LB ou BHI em *erlenmeyers* de 250mL de capacidade. Estes *erlenmeyers* foram incubados por 16h a 30°C e a 200rpm.

De seguida, os 50mL de conteúdo dos *erlenmeyes* foram transferidos para tubos de centrifuga de 80mL de capacidade e centrifugados por 15 minutos a  $19.658 \times g$  a 4°C, *Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Scientific)*. Recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se através de filtros de seringa de acetato de celulose 0,2  $\mu\text{m}$  (*Firilabo*), reservando o filtrado estéril a -20°C para uso futuro. Estes sobrenadantes foram testados através da técnica de difusão em agar para avaliar a atividade antibacteriana contra *E. coli*, *M. luteus* e *S. aureus*.

Verteram-se 35-40mL de meio agar nutritivo mole fundido num tubo esterilizado de 50mL e inoculou-se 100 $\mu\text{L}$  da bactéria alvo, de modo que esta fique uniformemente incorporada aquando do processo de solidificação do agar. As bactérias alvo adicionadas ao meio foram previamente diluídas em solução salina a 0,9% à concentração de  $10^5$  a  $10^4$ , a partir de uma cultura em 5mL de LB sob as condições de crescimento de 30°C por 24 horas a 200 rpm. Estas placas foram mantidas a 4°C por um período de até um mês.

Uma vez feitas as placas de agar mole com a bactéria incorporada, foram feitos poços no agar com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril e, com os poços selados por 10µL de agar, iniciou-se a aplicação de 100µL dos compostos a testar. Depois de carregados os poços, as placas foram colocadas a 4°C durante 2 horas, impedindo o crescimento da bactéria alvo, mas permitindo a difusão das amostras. Só após este tempo, foram colocadas a incubar conforme as condições necessária de crescimento para cada bactéria alvo, nomeadamente 28°C por 24-48h para o *M. luteus* e 38°C por 24h para o *S. aureus* e *E. coli*. Após o período de incubação, verificou-se ou não a presença de halos de inibição e efetuou-se o registo dos mm do diâmetro destes.

#### **2.4. Otimização da Produção por Imobilização das Células em Esferas de Agar**

Em virtude dos resultados obtidos na produção de sobrenadante com atividade antimicrobiana dos últimos sete isolados mencionados, foram selecionados dois que apresentaram um melhor desempenho.

O método utilizado foi o de Alkhalili *et al.* (2016), no qual aplicou-se a técnica de imobilização das bactérias produtoras em esferas de agar. Esta técnica permite otimizar a produção de sobrenadante com atividade antimicrobiana na medida em que aumenta a ação antimicrobiana sobre as bactérias alvo. Esta técnica baseia-se na imobilização das células produtoras em esferas de agar, denominadas de *beads*, que são inseridas e transferidas entre meios de cultura, denominado de *batches*, incubados sobre as mesmas condições. Os sobrenadantes destes *batches*, por sua vez, foram testados para averiguar a presença de atividade antimicrobiana.

Em uma primeira instância, foram produzidas *beads*, por incorporação das células obtidas por incubação, a 30°C por 16 horas a 200rpm, em 50mL de meio de cultura. As *beads* foram inseridas em *erlenmeyers* contendo o mesmo volume de meio de cultura e incubadas sob as mesmas condições. Após as 16h de incubação, as *beads* foram recicladas, sendo removidas do meio de cultura antigo e introduzidas em meio de cultura e *erlenmeyer* novos, o qual é incubado sob as mesmas condições. Os *batches* foram processados por 5 vezes, até se registar um decréscimo da atividade antimicrobiana. Os meios de cultura utilizados foram o meio LB e o meio BHI, de modo a verificar em qual destes o isolado apresenta maior produção de composto com atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana dos sobrenadantes filtrados dos vários *batches* a 0,2µm foi avaliada pelo método de difusão em agar.

Em uma segunda instância, aumentou-se a escala de produção de sobrenadantes com atividade antimicrobiana apenas em um isolado, S118E, de forma proporcional para 100mL de meio LB. Para tal utilizou-se o procedimento descrito abaixo.

1. Fez-se um pré-inóculo do isolado S118E em um tubo de ensaio de 5mL do meio LB, e incubou-se a 30°C a 200rpm por 16horas;
2. Em 100mL de meio LB em *erlenmeyers* com 500mL de capacidade, adicionou-se 2mL do pré-inóculo e incubou-se sobre as mesmas condições que o pré-inóculo;
3. Colocou-se os 100mL do conteúdo dos *erlenmeyers* distribuídos em 2 tubo de centrifuga e centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C com uma aceleração de nível 9 e uma desaceleração de nível 8;
4. Reservou-se o sobrenadante da cultura a -20°C e testou-se a sua atividade antimicrobiana;
5. Adicionou-se 50mL de solução salina a 0,9% a cada tubo de centrifuga e agitou-se no vórtex com o fim de lavar as células do meio LB residual;
6. Centrifugou-se sob as mesmas condições anteriores;
7. Entretanto, colocou-se o shot com óleo alimentar estéril em gelo e manter o agar bacteriológico a 3,5% fundido;
8. Descartou-se o sobrenadante resultante da lavagem das células;
9. Ressuspendeu-se o *pellet* bacteriano de cada tubo com 2,5mL de meio LB, e levou-se à estufa a 38°C por 15 minutos (evitar o choque térmico nas bactérias);
10. Preparou-se um *goblé* de 250mL de mistura solução salina e óleo alimentar na proporção de 2:1 respetivamente. Inicialmente colocou-se 150ml de solução salina e depois 75ml de óleo alimentar frio, deixando as duas fases separarem-se;
11. Adicionou-se 7,5mL de agar a 3,5% ao tubo de centrifuga com 2,5mL de meio com as bactérias em suspensão;
12. Envolveu-se com vórtex breve e colocou-se no *goblé* de 25mL;
13. Retirou-se com uma seringa estéril os 10mL de agar com bactéria e meio e faz-se pingar gentilmente sobre a mistura de solução salina: óleo alimentar. As *beads* envolvem-se inicialmente em uma camada de óleo frio adquirindo a forma esférica.
14. Deixou-se as *beads* transitarem para a fase da solução salina por um período de 5 minutos, enquanto repetiu-se o processo para o segundo tubo de centrifuga correspondente à outra metade do volume do *erlenmeyer* para a mesma mistura solução salina: óleo;
15. Após os 5 minutos, recolheu-se as *beads* com o recurso a um coador estéril;

16. Lavou-se as *beads* sobre o coador com solução salina por 3 lavagens intercaladas com a agitação das esferas para melhorar a eficácia das lavagens;
17. Deixou-se escorrer bem e introduziu-se as *beads* resultantes de 100mL de cultura em um novo *erlenmeyers* com 100mL de meio LB;
18. Incubou-se o *erlenmeyers* a 30°C a 200rpm por 16horas;
19. No dia seguinte, reciclou-se as *beads* colhendo-as num coador e transferindo-as para um novo *erlenmeyers* incubado sobre as mesmas condições;
20. A cultura de onde foram removidas as *beads*, com a presença de algumas células, foi centrifugada sob as mesmas condições anteriores;
21. O sobrenadante foi reservado em falcons limpos de resíduos a -20°C para uso futuro.

A atividade antimicrobiana dos sobrenadantes filtrados dos vários *batches* foi avaliada pelo método de difusão em agar e pelo método de diluição em meio líquido.

O método de diluição em meio líquido foi realizado em microplaca de 96 poços estéril e consiste em uma diluição seriada para metade de volume. Adicionou-se 100µL do composto a testar por fila, filtrado a 0,2µm, a 100µL de meio LB e, após *Up and Down*, foram transferidos 100µL sucessivamente para o poço seguinte. Este processo é iniciado no 2º poço e termina no 11º poço, descartando os 100µL excedentes no final das transferências, deixando o 12º poço como controlo do crescimento bacteriano e o 1º poço como controlo do meio de cultura. Após isto, os poços foram inoculados com 5µL da solução diluída da bactéria *S. aureus*, como mencionado anteriormente, iniciando a adição no 12º poço e terminando no 2º poço. A microplaca foi incubada, selada com parafilme, a 38°C entre 16-24horas, até ser detetado a olho nu o crescimento bacteriano. Estes passos vão de encontro com as normas estipuladas pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (2022) (EUCAST) com algumas modificações.

O método de diluição seriada permite obter mais informação sobre os compostos a serem testados dado que é possível distinguir os compostos que apresentam ou não atividade antimicrobiana e, também, determinar a partir de que diluição este composto deixa de apresentar atividade. Assim, foram definidas unidades arbitrárias de ação antimicrobiana por mililitro de amostra (UA/mL), seguindo a seguinte fórmula adaptada de Ansari *et al.* (2018):

$$\text{Unidades arbitrárias (UA/mL)} = \frac{\text{Valor recíproco da maior diluição}}{\text{Quantidade de bacteriocina usada (uL)}} \times 1000$$

De modo a confirmar a presença de crescimento bacteriano, executaram-se leituras da densidade ótica com recurso ao espectrofotómetro *Multiskan FC (ThermoScientific)* a 540nm e a 620nm.

## 2.5. Concentração e Fracionamento dos Sobrenadantes

Após recolhidos e filtrados os sobrenadantes, estes foram, em primeiro lugar, concentrados através do processo de liofilização. Para tal, recorreu-se ao concentrador *Hyper VAC* associado ao sistema de refrigeração *CoolSafe SCANVAC*, interligado com uma bomba de vácuo, em que as amostras são previamente congeladas a  $-56^{\circ}\text{C}$  e colocadas em centrifugação a 2000 rpm com 1 bar de pressão com duração de 20 horas. Iniciando o processo com 40mL em cada *falcon*, após este período de liofilização, recuperou-se um volume final de poucos mililitros, no entanto não completamente seco. Depois, é reestabelecido o volume final desejado de 4mL, perfazendo o restante com tampão fosfato 10mM pH 7,4 concentrando desta forma 10 vezes. O facto de não deixar evaporar toda a água do *falcon* contribui para a manutenção da atividade antimicrobiana. Este processo de concentração é essencial uma vez que, ao longo destes processos, ocorrem diluições e perdas de material com atividade antimicrobiana. Sendo assim, se a amostra estiver concentrada, é mais facilmente detetada alguma atividade mesmo considerando estas possíveis perdas.

Uma vez concentrados os sobrenadantes, fracionou-se e purificou-se as amostras através de dispositivos de ultrafiltração por centrifugação *Centricon* com membrana de 10kDa e com a precipitação utilizando sais, como o sulfato de amónio, e solventes orgânicos, como o acetonitrilo e acetona. Estes processos foram baseados nos estudos de Karagiota *et al.* (2021), Kumar & Aradhyam (2014) e Zhang *et al.* (2015).

### 2.5.1. Centricon

Os dispositivos de ultrafiltração por centrifugação *Centricon (Millipore)* com membrana de 10kDa utilizados estavam preservados a  $4^{\circ}\text{C}$  com o filtro embebido em uma solução contendo azida de sódio a 0,1%. Nestes, foram adicionados 10mL do sobrenadante concentrado e colocados a centrifugou-se a  $4500 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  com o nível de aceleração e de desaceleração 9.

Deste processo resulta o retentado e o eluído, sendo que o primeiro refere-se ao conteúdo que não atravessou a membrana, apresentando compostos com tamanho molecular superior a 10kDa, e o segundo ao conteúdo que atravessou a membrana, apresentando compostos com

tamanho molecular inferior a 10kDa. Ambas as frações foram filtradas através de filtros de seringa 0,2µm (*Frilabo*) e testadas para a presença de atividade antimicrobiana através do método de diluição em meio líquido.

### 2.5.2. Precipitação com 70% de Sulfato de Amónio

Esta metodologia foi baseada no artigo de Karagiota *et al.* (2021) e Sharma *et al.* (2011) com modificações. Neste caso, foi utilizado 6mL do conteúdo retentado do *Centricon*, previamente tamponado com 120µL de tampão Tris HCl a 20mM concentração final, seguido de vórtex. Depois, respeitando a concentração de 436 mg/mL para obter uma percentagem de saturação de 70%, adicionou-se 2,64 gramas de sulfato de amónio (*Chem-lab NV*) de forma gradual intercalado com agitação e mantido em gelo.

Uma vez adicionada a quantidade pretendida, colocou-se a amostra em agitação pelo período de 3 horas. Passado este tempo, foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C utilizando a centrífuga *Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Scientific)*. O *pellet* resultante da centrifugação foi ressuscitado até ao volume de 5mL com tampão fosfato 50 mM pH 7. Tanto o *pellet* ressuscitado com o sobrenadante resultante desta precipitação foram dialisados em tampão fosfato 10mM pH 7,5 durante a noite.

No dia seguinte recolheu-se para falcons 8mL do *pellet* ressuscitado e 21ml do sobrenadante, filtrados a 0,2µm e testados, igualmente, através do método de diluição em meio líquido.

### 2.5.3. Precipitação com Solventes Orgânicos

A metodologia utilizada para a precipitação com acetonitrilo foi baseada no artigo de Kumar & Aradhyam (2014) e Zhang *et al.* (2015) e a metodologia utilizada para a precipitação com acetona no artigo Zhang *et al.* (2015), em ambos os casos com modificações.

Por um lado, partindo de um volume inicial de 5mL, adicionou-se, de uma só vez, o acetonitrilo num rácio de 2:1, ou seja, 10mL de acetonitrilo para 5mL de amostra a precipitar. Por outro lado, partindo da mesma quantidade de amostra, 5mL, e uma vez com a acetona fria em gelo, foram adicionados, de uma só vez, 4 volumes de acetona para 1 volume de amostra, por outros termos, 20mL de acetona para 5mL de sobrenadante concentrado.

Em ambos os casos, os *falcons* com a mistura a precipitar, foram, após breve agitação, mantidos a -20°C por 3 horas com o falcon na posição vertical, facilitando a separação de duas

fases. Depois, centrifugou-se a 4690 x g por 20 minutos a 4°C. Ambas as fases, mais densa e menos densa de ambos os casos, resultantes da centrifugação, foram liofilizadas individualmente por completo sobre as condições mencionadas anteriormente, com uma duração de 30 minutos para as fases mais densas e 16 horas para as fases menos densas. Uma vez liofilizadas, foram ressuspensas, todas as fases, em tampão fosfato 10mM pH 7,4 até ao volume de amostra inicial, 5mL.

Para os passos seguintes, escolheu-se utilizar apenas o processo de precipitação com acetona, processo este que foi otimizado. Esta otimização refletiu-se no volume a ressuspender, em vez dos 5mL de volume inicial, a fração do sobrenadante liofilizado era ressuspensa com o mesmo tampão para 1mL. Isto faz concentrar as amostras 50 vezes relativamente ao sobrenadante recolhido das culturas.

Ambas as frações das duas reações de precipitação foram, então, filtradas através de filtros de seringa 0,2µm (*Frilabo*) e testadas, da mesma forma, através do método de diluição em meio líquido.

## 2.6. Teste de Estabilidade Térmica

Começou-se por realizar um ensaio de estabilidade térmica ao composto obtido com atividade antimicrobiana e, deste modo, interpretar se estas propriedades antimicrobianas após serem expostas à temperatura se mantinham ou não.

Assim, para este ensaio, foi utilizada a amostra do sobrenadante concentrado 10 vezes, resultante das bactérias imobilizadas, no entanto, diluída na proporção de 200:800 de tampão fosfato 10mM pH 7,4, diluída desta forma 5 vezes relativamente à concentração inicial da amostra.

Em primeiro lugar, as amostras foram submetidas durante 1 hora às temperaturas de 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C e a 121°C por 15 minutos (ciclo de esterilização do autoclave). Estas incubações foram realizadas em banho-maria, à exceção da incubação a 90°C e a 100°C, que foram realizadas em bloco térmico (*Biosan*), e a 121°C, ciclo de esterilização no autoclave (Aunpad *et al.*, 2007; Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Hammami *et al.*, 2009 e Mouloud *et al.*, 2013). A atividade antimicrobiana após a incubação foi testada pelo método de diluição em meio líquido, como descrito anteriormente.

Em segundo lugar, as amostras foram expostas a diferentes temperaturas ao longo do tempo, de modo a determinar em que ponto se perdia atividade antimicrobiana. As temperaturas e os

tempos utilizados estão expressos na Tabela 2. Neste ensaio, utilizou-se a amostra eluída do *Centricon*, diluída na proporção 200:800 da mesma forma que anteriormente, dado que, assim, excluía-se da amostra enzimas produzidas pela própria bactéria (com tamanho superior a 10kDa), logo, excluindo a hipótese de que, sobre a ação da temperatura, estas enzimas degradariam o composto antimicrobiano, enviesar os resultados do ensaio. Sem estas enzimas, o eluído apresentará a atividade resultado das temperaturas exercidas.

*Tabela 2 – Temperaturas e períodos de incubação do teste de estabilidade térmica.*

Temperatura	Tempo de exposição								
	3h	6h	9h	15h	18h	24h	48h		
37°C	3h	6h	9h	15h	18h	24h	48h		
50°C	1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h	6h	8h	15h
60°C	1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h	6h	8h	15h
80°C	10m	20m	30m	40m	50m				
100°C	1m	2m	5m	10m					

Para além disto, foi incubada uma amostra à temperatura ambiente rondando os 20°C por 54 horas, de modo a avaliar a estabilidade à temperatura ambiente. Todas estas amostras foram analisadas em microplaca de 96 poços por aplicação de 100µL num único poço com 100µL de meio LB.

## 2.7. Teste de Sensibilidade à Ação Enzimática

Através do ensaio de sensibilidade à ação enzimática é possível obter a caracterização da natureza proteica do composto com atividade antimicrobiana. O composto apresenta natureza proteica quando é degradado por ação de pelo menos uma protéase (Lei *et al.*, 2020).

Para este ensaio, foi utilizada a amostra do eluído do *Centricon*, diluído na proporção de 200:800 com tampão fosfato 10mM pH 7,4. A amostra foi submetida ao tratamento com a proteinase K, tripsina e subtilisina A nas condições de incubação descritas na Tabela 3.

Após a incubação, procedeu-se à inativação das enzimas no bloco térmico, a 100°C por 5 minutos. Após este tempo, os *ependorfs* foram colocados no gelo de modo a travar a reação. Deve-se mencionar que, para cada reação enzimática, foram realizados controlos, utilizando tampão fosfato 10mM pH 7,4 no lugar das enzimas. As amostras tratadas, após filtradas a 0,2µm (*Frilabo*), foram testadas através do método de diluição descrito anteriormente (Kindoli *et al.*, 2012 e Mouloud *et al.*, 2013).

**Tabela 3** - Enzimas utilizadas no ensaio de sensibilidade térmica, quantidade de enzima e amostra por ensaio e condições de incubação.

Enzima	Concentração final (mg/mL)	Quantidade de enzima/tampão (µL)	Quantidade de amostra (µL)	Condições
Proteinase K 20mg/mL (Merck)	1	6	114	50°C por 1h
	2	12	108	
	5	30	90	
	5	30	90	37°C por 2h
Tripsina 40mg/mL (Sigma)	1	3	117	37°C por 1h
	2	6	114	
	5	15	105	37°C por 2h
Subtilisina A 40mg/mL (Sigma)	5	15	105	37°C por 2h

## 2.8. Purificação por *Superdex Peptide*, C18 fase reversa e FPLC

### 2.8.1. Cromatografia em Gel

Foi utilizada a coluna *Superdex Peptide* 10/300 GL (*Cytiva*) com o propósito de separar proteínas e/ ou péptidos. Esta coluna é constituída por uma malha de esferas de agarose e dextrano com 13µm de tamanho na qual é capaz de suster 24mL ao longo de 300mm de comprimento com 10mm de largura, apresentando um valor superior a 30.000 pratos teóricos.

A coluna foi submetida às condições de 1,5 MPa de pressão e 0,6 mL/min de flow rate com a injeção 300 a 900µL de amostra, sobrenadante da precipitação com acetona 50 vezes concentrado, contendo frações de 1,8mL de amostra recolhida em cada *ependorf*.

Inicialmente, realizou-se uma primeira cromatografia e foi analisada a atividade antimicrobiana em 6 frações, correspondendo a 6 picos do cromatograma. Depois, efetuou-se mais 5 cromatografias de modo a obter mais quantidade de material fracionado. Destas cromatografias foram produzidos cromatogramas com picos semelhantes. Todas as frações obtidas que correspondem a cada um dos picos foram divididas por 7 grupos, -B, A, B, C, D, E e F, em que cada grupo representa um pico distinto, com base no primeiro cromatograma. Estas frações escolhidas foram liofilizadas, sob as mesmas condições, e ressuspendidas com água destilada para um volume final de 400µL, apresentando um volume inicial de 1,5mL.

Utilizando o conteúdo de cada pico mais concentrado, foi realizada uma nova cromatografia com a mesma coluna e sob as mesmas condições para o grupo C, com o objetivo de fracionar ainda mais o pico de interesse. As frações obtidas na primeira cromatografia e na cromatografia

resultante do grupo C foram filtradas a 0,2 $\mu$ m (*Gelman Sciences*) e testadas através do método de diluição em meio líquido, mencionado anteriormente.

### 2.8.2. Cromatografia de Fase Reversa - C18

Em paralelo, foram utilizadas colunas de centrifugação contendo resina C18, *Pierce C-18 Spin Columns* (*Thermo Scientific*), seguindo as instruções fornecidas pela marca adaptado à amostra utilizada. Após ativar a coluna com 200  $\mu$ L água Milli Q e acetona a 50%, a coluna foi equilibrada com 200  $\mu$ L do tampão fosfato a 20mM, pH 7,6 com a adição de 0,15M de NaCl. Depois, adicionou-se 150  $\mu$ L de sobrenadante da precipitação com acetona concentrado 50 vezes, centrifugado previamente a 1500 x g por 1 minuto, repetindo o processo. Uma vez a amostra retida na coluna, foi lavada por 3 vezes utilizando 200  $\mu$ L de tampão fosfato a 20mM, pH 7,6, com a adição de 0,15 NaCl. Por fim, a amostra retida na coluna foi eluída por duas vezes com 20  $\mu$ L de acetona a 100% e centrifugada sob as condições anteriores. Depois de evaporada a acetona, o conteúdo presente no *ependorf* de recolha foi ressuspendido com 15  $\mu$ L de tampão fosfato a 10mM, pH 7,4.

Com a mesma resina, foram empacotadas colunas adaptadas a seringas com volume de 1mL de capacidade. Foi ressuspendido num *ependorf* resina C18 em 500  $\mu$ L de acetona até a acetona ficar turva. Depois, esta suspensão foi carregada na coluna e, com o auxílio de uma seringa, foi retirada a acetona, deixando apenas a estrutura da coluna de resina. A esta foi adicionada água destilada confirmando a sua estabilidade.

Inicialmente começou-se por fazer a eluição desta coluna com acetona a 100%, mas, depois de interpretar os resultados, verificou-se que seria mais eficaz se fossem feitas frações de certas percentagens acetona. Da mesma forma, esta coluna foi ativada e equilibrada, de seguida carregada por 3 vez com o mesmo 1mL de amostra, sobrenadante da precipitação com acetona concentrado em 50 vezes, e lavada por 3 vezes com 5mL de tampão fosfato a 20mM com 0,15M de NaCl. A eluição foi feita por 4 partes: uma fração de 5mL a 15% de acetona, uma fração de 5mL a 30% de acetona, uma fração de 5mL a 60% de acetona e uma fração de 5mL a 100% de acetona. Estas amostras foram liofilizadas por 1hora a 200rpm com vácuo de 1 bar e a -56°C. O conteúdo de cada *ependorf* foi ressuspendido em 1mL com tampão fosfato 10mM pH 7,4, no qual foi usado o mesmo volume para ressuspender todos os *ependorfs* correspondentes à mesma eluição.

Assim, as amostras recolhidas pela *Spin Columns* e pela coluna com resina C18 foram filtradas a 0,2 $\mu$ m (*Gelman Sciences*) e testadas pelo método de diluição em meio líquido.

### 2.8.3. FPLC - Resource RPC 3mL

A coluna usada para a técnica de cromatografia líquida de proteínas rápida, do inglês “*Fast protein liquid chromatography*” mencionada pela sigla FPLC, foi a Resource RPC (Cytiva) desenhada para executar cromatografias de fase reversa. Esta coluna de 3mL de capacidade é composta por resina *SOURCE 15RPC* que é baseada em esferas de 15µm de diâmetro rígidas e monodispersas de co-polímeros de estireno-divinilbenzeno.

Neste processo foram utilizados o tampão A, tampão fosfato a 20mM pH 7,4, e o tampão B, acetona a 100%. Foram injetadas 900µL de duas amostras distintas neste processo, sendo a primeira amostra a fração de eluição com 30% de acetona (30% C18) e a segunda amostra a fração de eluição com 60% de acetona (60% C18), ambas resultantes do processo de cromatografia de fase reversa com resina C18. Antes de carregar as amostras na coluna, foram centrifugadas por 3 minutos a 10.000 x g. Os *pellet's* resultantes foram ressuspensos em 1mL de tampão fosfato 10mM pH 7,4, e o sobrenadante foi aplicado na coluna. Foi aplicado um gradiente de eluição com o tampão B para ambas as amostras. A primeira amostra teve um gradiente iniciando em 15% e atingindo 90% e a segunda amostra um gradiente iniciando em 30% e atingindo 100%.

Nestes processos foram também divididas as frações de ambos os cromatogramas em 5 grupos, A, B, C, D e E, com o fim de identificar em que parte do cromatograma verifica-se atividade antimicrobiana. Estes grupos foram formados com base nas alterações registadas em cada cromatograma, no qual alguns são associados a picos. As frações foram liofilizadas por 16 horas a 200rpm com vácuo de 1 bar e a -56°C. Depois de agrupadas, foram ressuspensas com 900µL de tampão fosfato 10mM pH 7,4 para cada grupo, mantendo assim o volume inicial injetado.

Os cinco grupos de frações de cada cromatografia e os *pellet's* ressuspensos em tampão fosfato foram filtrados a 0,2µm (*Gelman Sciences*) foram testados pelo método de diluição em meio líquido.

## 2.9. Quantificação Proteica

Para quantificar a proteína nas amostras ao longo do processo e verificar até que ponto estas foram purificadas foi utilizando o *Pierce Kit BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific)*. As amostras testadas foram as seguintes:

1. Sobrenadante de cultura de células livres;

2. Sobrenadante após imobilização das células *batch* 1;
3. Sobrenadante após imobilização das células *batch* 2;
4. Sobrenadante após imobilização das células *batch* 3;
5. Sobrenadante após imobilização das células *batch* 4;
6. Sobrenadante após imobilização das células *batch* 5;
7. Sobrenadante concentrado (volume inferior 10 vezes);
8. Sobrenadante da precipitação com acetona;
9. Eluído com 100% de acetona da coluna C18;
10. Eluído com 30% de acetona da coluna C18;
11. Eluído com 60% de acetona da coluna C18;
12. Fração de 30%, grupo C, HPLC;
13. Fração de 60%, grupo C, HPLC.

Foi realizada uma solução de trabalho na proporção de 196 $\mu$ L:4 $\mu$ L, correspondendo a primeira à solução A e a segunda à solução B, ambas provenientes do kit. Depois, foi adicionado a uma microplaca 10 $\mu$ L de amostra para as amostras de 9 a 13, 5  $\mu$ L de amostra com 5 $\mu$ L de tampão fosfato 10mM pH 7,4 para as amostras de 1 a 6 e 0,2  $\mu$ L de amostra com 9,8  $\mu$ L de tampão fosfato 10mM pH 7,4 para as amostras 7 e 8. Foi necessário fazer diluições nas amostras de 1 a 8 devido à elevada concentração de proteína. Após inseridas as amostras, foi adicionado 190 $\mu$ L de solução de trabalho, levou-se a incubar por 30 minutos a 38°C e, ao fim deste tempo, agitou-se por 15 segundos e fez-se a leitura a 540nm no espectrofotómetro *Multiskan FC* (*ThermoScientific*). Com as densidades óticas calculou-se a quantidade de proteína que continha cada amostra.

## 2.10. Espetrometria de Massa MALDI-TOF MS

Foi enviado para o Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade NOVA de Lisboa duas amostras para espetrometria de massa MALDI-TOF MS com o fim de obter a massa intacta dos péptidos que se possam apresentar nas amostras e a identificação destes. Sendo assim, as duas amostras que foram enviadas foram a amostra eluída com 30% de acetona na coluna C18 e a amostra eluída com 60% de acetona na coluna C18, ambas com 100 $\mu$ L.

## 2.11. Amplificação e Sequenciação do Gene 16S da Bactéria S118E

### 2.11.1. Extração de DNA por Lise Térmica

A extração do DNA para amplificação e sequenciação do gene 16S foi feita com recurso à técnica de lise térmica. Nesta técnica é causado um choque térmico às células, degradando assim as membranas e conseqüentemente libertando o DNA.

Para tal, iniciou-se com uma cultura do isolado incubado a 30°C, 200rpm por 16 horas, onde é retirado 1mL e centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos. Uma vez descartado o sobrenadante, colocou-se 1mL de água destilada, agitando com o vórtex, e centrifugou-se nas mesmas condições, descartando o sobrenadante. Estes últimos passos de lavagem foram repetidos por mais uma vez. Depois de lavadas as células, foram adicionados 300µL de água destilada, ressuspendidas as células sob agitação e armazenadas por 2 horas a -80°C. Ao fim deste período, foram colocadas de imediato a 95°C por 15 minutos. Depois seguiu-se uma nova centrifugação 13.000 rpm por 5 minutos e do sobrenadante resultante foram recolhidos 200µL e reservados a -20°C para uso futuro.

### 2.11.2. Amplificação 16S

A amplificação do gene 16S tem como fim ser enviado para sequenciação. A utilização dos *primers* universais nesta amplificação irá permitir obter um fragmento de DNA de maiores dimensões, comparativamente ao fragmento produzido pelos *primers* específicos de *Bacillus*, facilitando a homologia de sequências com a bases de dados.

Os *primers* utilizados foram o *Primer R* 1492R, com a sequência 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3' e o *Primer F* 8F, com a sequência 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3'.

O mix de reação de 25µL por amostra utilizava 20,3µL de água *Ambion Nuclease-Free Water Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)*, 2,5µL de tampão *dream tap 10x*, 0,5µL de DNTP's a 10mM, 0,25µL de *primer F* 10mM, 0,25µL de *primer R* 10mM, 0,2µL de taq polimerase *Dream taq* e, por fim, 1µL de DNA das amostras a testar ou do DNA do controlo positivo (isolado S157B). Foi feito, também, um controlo negativo contendo 1µL da mesma água em substituição do DNA.

Para a reação de amplificação foi utilizado o termociclador *Applied Biosystems (Life Technologies)* com as condições descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de amplificação do gene 16S utilizando os primers 8F e 1492R.

Desnaturação inicial	Ciclos 30X			Extensão final	Terminado
	Desnaturação	Anelamento	Extensão		
5 minutos a 95°C	30 segundos a 95°C	30 segundos a 52°C	2 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C	Infinito a 8°C

O produto do PCR foi analisado em gel de agarose a 1,2%, 0,36 gramas de agarose para 30mL de tampão TBE 0,5x, ao qual foi adicionado 3µL de *SYBR Safe (Invitrogen)*, e foi submetido a 100V por 40 minutos. Ao carregar as amostras, para cada 5µL de alíquotas de DNA foi adicionado 1µL de tampão de amostra 6X LD (*Thermo Scientific*) e foi carregado 4µL do marcador molecular *1Kb plus (Thermo Scientific)*. Após a migração das bandas, o gel foi retirado da tina de eletroforese para o visualizador com radiação UV (*Bio-Rad*) no qual armazenaram-se imagens do gel.

### 2.11.3. Purificação do Produto de PCR

O Kit DNA *Clean and Concentrator (Zymo Research)* foi usado para purificar e concentrar o produto de PCR da amplificação do gene 16S. Para tal, este foi executado conforme as indicações provenientes do protocolo do kit, com algumas modificações.

Inicialmente, foi adicionado a um *ependorf* estéril 95 µL do produto de PCR e 475µL de *DNA binding buffer*, respeitando a proporção fornecida no protocolo, seguindo-se de agitação no vórtex. Esta mistura foi transferida para uma coluna *Zymo-Spin* inserida em um tubo coletor seguindo de centrifugação a 16.000 x g por 30 segundos, descartando o produto passado pela coluna. Adicionou-se 200 µL de *DNA wash buffer* à coluna e prosseguiu-se com a centrifugação sob as mesmas condições. Este último passo foi repetido mais uma vez. Por fim, foi adicionado 30µL de *DNA elution buffer* à coluna, deixou-se incubar à temperatura ambiente por um minuto. Após colocar um novo tubo de colheita, foi centrifugada pela última vez os tubos sob as mesmas condições, eluindo o DNA da matriz para o tubo de colheita.

A concentração de DNA no produto eluído foi medida através do espectrofotômetro Nanodrop 2000c (*Thermo Scientific*) a 260nm de absorvância e foi armazenado a -20°C até futuro envio para sequenciação do gene 16S.

### 2.11.4. Sequenciação do 16S e Análise dos Resultados

As amostras do gene 16S amplificadas com os *primers* universais foram enviadas para sequenciação no laboratório *STAB VIDA – Inv e Serv. Ciências Biológicas, Lda.*, bem como alíquotas dos mesmos *primers*, 8F e 1492R. Com estes, foram feitos dois sequenciamentos do

tipo *Sanger*, um *forward* e outro *reverse*, que serviram, através do programa *Bioedit*, para construir a sequência consensus do gene 16S.

Utilizando a ferramenta *Blast* do *webserver NCBI*, foi possível fazer o estudo da homologia entre esta sequência consensus e a base de dados, permitindo a identificação do isolado.

## 2.12. Sequenciação do Genoma do Isolado S118E

### 2.12.1. Extração e Purificação do DNA Total

Para a extração do DNA para sequenciação do genoma do isolado foi utilizado o Kit *Quick-DNA Fungal/ Bacterial Miniprep (Zymo Research)* seguindo as instruções do protocolo fornecido com o Kit, com modificações. Para tal, foi feito um inóculo do isolado S118E em 5mL de LB incubado a 30°C a 200rpm por 17 horas, retirou-se 1mL de cultura e centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 1mL de Água Milli Q. Esta suspensão apresentava uma densidade ótica de 1.541 a 600nm de absorvância no espectrofotômetro (*Implen*).

Desta suspensão foi retirado 200µL para o tubo de lise *ZR BashingBead* e adicionados 750µL de tampão *BashingBeads*. Este tubo esteve em agitação máxima por 15 minuto e depois foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 x g. 400µL do sobrenadante resultante foram transferidos para o filtro *III-F Zymo-Spin*, inserido num tubo coletor e centrifugado por 8000 x g por 1 minuto. Ao produto recolhido no tubo coletor, foi adicionado 1200 µL de tampão *Genomic Lysis* e, desta nova mistura, foram transferidos 800µL para uma coluna *IICR Zymo-Spin* inserido em um tubo coletor, e centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto. À coluna com o DNA retido, em um novo tubo coletor, foram adicionados 200µL de tampão *DNA Pre-Wash* e centrifugado nas mesmas condições. De seguida, foram adicionados 500µL de tampão *g-DNA Wash* e centrifugado da mesma forma.

Por fim, para a eluição do DNA da coluna, foi colocado um *eppendorf* estéril de 1,5mL. Esta eluição foi feita por duas vezes: uma primeira com 50µL de tampão e uma segunda com outros 50µL de tampão, obtendo assim duas amostras de DNA, eluído por sua vez com tampão *DNA Elution* e centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos.

Este DNA foi analisado em gel de agarose a 1,5%, 0,45 gramas de agarose para 30mL de tampão TBE 0,5x, e submetido a 100V por 30 minutos. As restantes condições assemelhem-se às mencionadas anteriormente.

A concentração do DNA extraído foi medida através do espectrofotômetro Nanodrop, mencionado anteriormente, e quantificado pelo Qubit 4 *Fluorometer Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)*. Neste, é produzida uma solução de trabalho constituída pela mistura entre o reagente e o tampão, ambos fornecidos pelo kit Qubit, na proporção 1:199  $\mu\text{L}$  respetivamente. De seguida, são adicionados 5 $\mu\text{L}$  de DNA a 195 $\mu\text{L}$  de solução de trabalho, agitando-se brevemente e deixando incubar por 2 minutos a temperatura ambiente. Por fim, é executada a quantificação das amostras.

### 2.12.2. Sequenciação do Genoma e Mineração Genómica

Para esta etapa o laboratório utilizado foi *Novogene*, que se baseou na plataforma *Illumina MiSeq* para sequenciar o genoma microbiano. Para tal, foram enviados 72 $\mu\text{L}$  de DNA contendo 1014ng de concentração total. Este foi assemblado com o genoma de referência *Bacillus pumilus* com o *accession number* ASM302079v1 no *NCBI*, submetido a 27 de março de 2018 pela Universidade de *Rhode Island (National Center for Biotechnology Information, 2023)*.

Com os resultados, foram enviados em sequência *FASTA 13 contigs*. A análise destes, em conjunto e em separado, foi feita através dos seguintes *web surveys*: *antiSMASH 7*, *MIBiG*, *NCBI e Blast2Go*.

O *antiSMASH* versão bacteriana, *web server* do Portal Bioinformático dos Metabolitos Secundários, foi usado para detetar genes biosintéticos denominados de clusters de genes biosintéticos, BGCs, do inglês *Biosynthetic Gene Clusters*. Neste, é possível fazer uma comparação entre o genoma de estudo e as bases de dados, que engloba a própria base de dados *antiSMASH*, base de dados *MIBiG*, entre outras. Também, apresenta outras ferramentas, como o *Blast*, que permitem indicar todas as características conhecidas sobre certo composto.

No *NCBI* foi depositado o genoma da bactéria (*accession number* PRJNA1018523) e no *Blast2Go*, em conjunto com o *Software OmicsBox*, foram feitas as anotações do genoma, mais propriamente, a ontologia genética.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Cultura dos Isolados

Inoculou-se 20 isolados em AN e em T3 por um período de 24 horas e, em alguns casos, de 48 horas a 72 horas, para os isolados que necessitaram de mais tempo para se desenvolverem. Estes casos podem estar relacionados com o tempo de armazenamento ou com o baixo número de esporos contidos nos papéis de filtro.

Observou-se as bactérias de cada isolado recém incubadas em meio AN sob o microscópio contraste de fase (*Olympus* BH2). Neste, observou-se o formato espectral de bastonete, a densidade das bactérias, a agregação entre elas, a presença ou ausência de esporos, a localização destes esporos (espaço intracelular ou extracelular) e, caso estivessem no espaço intracelular, em que parte da célula se alojavam (parte central ou periférica da célula). Na Figura 3 observa-se *Bacillus* correspondentes ao isolado S118E inoculado em placas de AN em fase exponencial do crescimento. Observou-se baixa densidade de esporos, maioritariamente, no espaço extracelular.

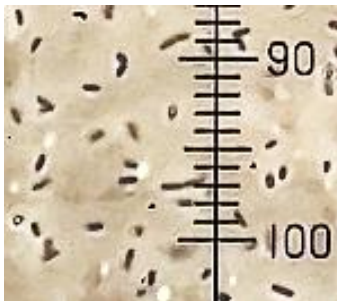


Figura 3 - Fotografia ao microscópio contraste de fase de células do isolado S118E inoculado em meio AN. Objetiva de 40x.

No processo de produção e armazenamento de esporos em papéis de filtro, executou-se inóculos em meio T3, pobre em nutrientes, induzindo as células à produção de maior quantidade de esporos. Estes foram igualmente analisados ao microscópio com o objetivo de confirmar a presença de elevada densidade de esporos.

#### 3.2. Detecção de Atividade Antimicrobiana nos Isolados

O *screening* inicial utilizado para detetar atividade antimicrobiana nos 20 isolados foi realizado pelo teste de co-inoculação destes em AN com as bactérias alvo. Os resultados apontam para 8 isolados com baixa atividade, 5 isolados com atividade intermédia e 7 isolados

com elevada atividade antimicrobiana (Tabela 5). Considerou-se baixa atividade quando o isolado inibia 5mm ou menos em uma das bactérias alvo, atividade intermédia quando o isolado inibia 10mm ou menos em uma das bactérias alvo ou inibia 5mm ou mais em mais que uma das bactérias alvo e atividade elevada quando inibia 10mm ou mais em duas bactérias alvo.

**Tabela 5** - Resultados do screening do teste de co-inoculação nas bactérias alvo: *M. luteus*, *E. coli* e *S. aureus*. (-) sem atividade; (+) atividade entre 1-5mm; (++) atividade entre 5-10mm e (+++) atividade entre 10-20mm.

Atividade	Isolados	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Baixa	S15D	-	-	-
	S26D	+	-	-
	S27A	+	-	-
	S30D	-	-	-
	S62B	-	-	-
	S71E	+	-	-
	S80E	+	-	-
	S110D	-	-	-
Intermédia	S66A	+	-	+
	S91B	+	-	+
	S92B	+	+	+
	S115B	+	-	+
	S127E	++	-	+
Elevada	S53C	+++	+	+++
	S117B	+++	++	+++
	S118E	+++	++	+++
	S124A	+++	++	+++
	S150C	+++	+	+++
	S157B	+++	++	+++
	S160A	+++	+	+++



**Figura 4** – Teste de co-inoculação do isolado S118E em AN com as bactérias alvo. Apresenta 20mm de inibição no *M. luteus*, 15mm de inibição no *S. aureus* e 10mm de inibição na *E. coli*.

Na Figura 4 observa-se os resultados em placa de AN do teste de co-inoculação, do isolado S118E, nas bactérias alvo *M. luteus*, *S. aureus* e *E. coli*. Verificou-se a inibição de 20mm no *M. luteus*, inibição de 15mm no *S. aureus* e inibição de 10mm na *E. coli*.

Os *Bacillus* são produtores de diversos metabolitos secundários com ação inibitória sobre diversos organismos, nos quais estão incluídas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Mercado & Olmos, 2022). Estes metabolitos secundários com ação antimicrobiana são denominados de AMP's, ou péptidos antimicrobianos, os quais são classificados de diversas formas, sendo o mecanismo de biossíntese uma das delas. Nesta classificação, os AMP's são divididos em síntese ribossomal (RiPP) e síntese não ribossomal (NRPS). No entanto, quando a origem da síntese de determinado péptido é desconhecida é atribuído o termo de BLIS (*bacteriocin-like inhibitory substances*). Estes compostos apresentam-se termolábeis e sensíveis à ação das enzimas proteolíticas. Quando os compostos são sintetizados por via ribossomal e têm origem bacteriana são denominados de bacteriocinas (Liu *et al.*, 2022; Mussa *et al.*, 2020). Estes compostos antimicrobianos podem ser específicos para determinado tipo de bactéria, como é o caso da pumilina 4 produzida, por *B. pumilus*, com ação sobre Gram-positivas (Aunpad *et al.*, 2007). Também, podem apresentar atividade tanto para bactérias Gram-positivas como para bactérias Gram-negativas (Freitas-Silva *et al.*, 2021).

Neste caso, os isolados que apresentaram elevada atividade antimicrobiana, bem como o isolado S92B com atividade intermédia, produziram compostos antimicrobianos BLIS tanto para Gram-positivas como para Gram-negativas. Um único composto pode ser responsável pela ação antimicrobiana sobre as 3 bactérias alvo, no qual estas apresentam níveis de sensibilidade diferentes, como pode ser o resultado da ação de mais do que um composto antimicrobiano com especificidades diferentes. De qualquer das formas, a ação contra Gram-positivas demonstra-se mais evidente entre os resultados do que a ação verificada contra Gram-negativas.

### **3.3. Obtenção das Moléculas Ativas em Cultura Líquida**

#### **3.3.1. Sobrenadante dos 7 Isolados Seleccionados**

Com o objetivo de caracterizar a/as molécula/s com atividade antibacteriana, fizeram-se culturas em meio líquido, de modo a recuperar essas moléculas do meio de cultura. Com base nos resultados de co-inoculação, começou-se por produzir 50mL de cultura em meio LB e em meio BHI para cada um dos 7 isolados que apresentaram elevada atividade antimicrobiana.

Depois, foram recolhidos os sobrenadantes e, após filtração em membrana de 0,2µm, testados em placas de agar mole incorporadas cada placa com uma das bactérias alvo.



**Figura 5** - Placa de agar mole de *M. luteus* usada no teste de difusão em agar das bactérias S53C, S117B e S150C produzidas em meio de cultura BHI e LB. 1- BHI S53C, 2- BHI S117B, 3- BHI S150C, 4- LB S53C, 5-LB S117B e 6- LB S150C. Halo de inibição no poço 5, S117B em meio LB.



**Figura 6** - Placa de agar mole de *M. luteus* usada no teste de difusão em agar das bactérias S118E, S124A, S157B e S160A produzidas em meio de cultura LB. 1- S118E, 2-S124A, 3-S157B e 4-S160A. Halo de inibição no poço 1, S118E em meio LB.

Através das placas de agar mole, observou-se a formação de halos de inibição em *M. luteus* pelos isolados S117B e S118E, ambos incubados em meio LB. Relativamente ao isolado S117B, verificou-se o halo de inibição com 4mm de diâmetro e em relação ao isolado S118E verificou-se o halo de inibição com 6mm de diâmetro. Não se verificaram, no entanto, halos de inibição em *S. aureus* e *E. coli*.

Com base nos resultados, verificou-se que a atividade antimicrobiana que se apresentava nas placas do teste de co-inoculação, com ação sobre as 3 bactérias alvo, não estava presente após inoculados os isolados em meio líquido. O único aspeto que difere entre os dois casos são as condições de crescimento dos isolados, sendo que no primeiro caso estes cresceram em meio sólido e no segundo caso cresceram em meio líquido.

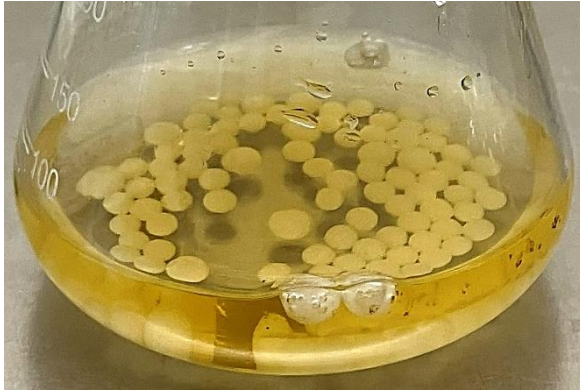
Os *Bacillus* são capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana diferentes quando expostos a diferentes condições de cultura (Mercado & Olmos, 2022). Estas condições, como temperatura, pH do meio, agitação, densidade bacteriana, regulam a expressão dos compostos antimicrobianos e, neste caso, os isolados poderão ter sido afetados pela diferença de densidade bacteriana detetada pelos mecanismos de *quorum sensing*. A subtilina é um dos casos em que a sua expressão é regulada por estes mecanismos (Abriouel *et al.*, 2010).

De acordo com os autores Alkhalili *et al.* (2016), esta redução de atividade antimicrobiana foi também verificada nas mesmas circunstâncias, a partir do momento em que as células se apresentavam a crescer dispersas em meio líquido. Assim, os autores incorporam as células em meio sólido, imobilizando-as em elevada densidade em esferas de agar bacteriológico, e inoculando-as em meio líquido. Com esta técnica, foi possível assemelhar o modo como estas células cresceram no teste de co-inoculação, em meio sólido no interior das esferas, e, assim, conseguir recuperar, através do meio de cultura líquido, as mesmas propriedades antimicrobianas que se verificaram anteriormente. De facto, os autores conseguiram otimizar a produção de compostos antimicrobianos por via desta técnica, verificando um aumento da atividade antimicrobiana.

### **3.3.2. Otimização da Produção de 2 Isolados Através da Imobilização das Células em Esferas de Agar**

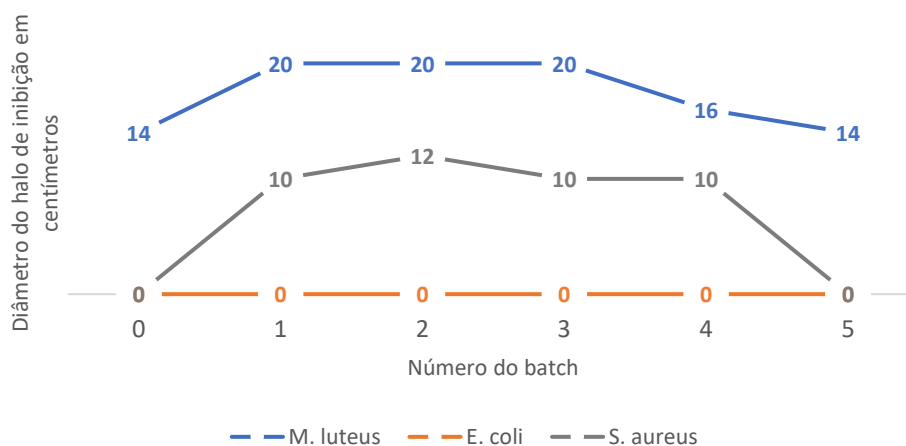
Considerando a possibilidade destes isolados terem sido afetados pela diferença de densidade celular e a alternativa da imobilização das esferas proporcionar o aumento desta densidade, foi executada a imobilização as células dos isolados S117B e S118E com o fim de otimizar a produção de compostos com atividade antimicrobiana no sobrenadante. Para dar continuidade a este processo, utilizou-se o meio de cultura LB, visto que os resultados com atividade antimicrobiana se verificaram no crescimento destes isolados neste meio.

Produziu-se 50mL de cultura dos isolados em LB. Depois, foram recolhidas as células por centrifugação que, por sua vez, foram ressuspendidas em meio de cultura LB e agar a 3,5% para a formação das esferas. Após incubação das esferas em outros 50mL de meio LB, recolheu-se os sobrenadantes e, após filtrados por membrana 0,2µm, testou-se em placas de agar mole para cada bactéria alvo. Estas esferas foram reutilizadas 5 a 6 vezes (5 a 6 *batches*) até se verificar decréscimo da atividade antimicrobiana.



**Figura 7** - Esferas de agar com o isolado S117B em 50mL de LB.

Para o isolado S117B, foram obtidos os seguintes resultados presentes na Figura 8.



**Figura 8** - Inibição de crescimento nas bactérias alvo no teste de difusão em agar pelo sobrenadante filtrado do isolado S117B em 50mL de LB.

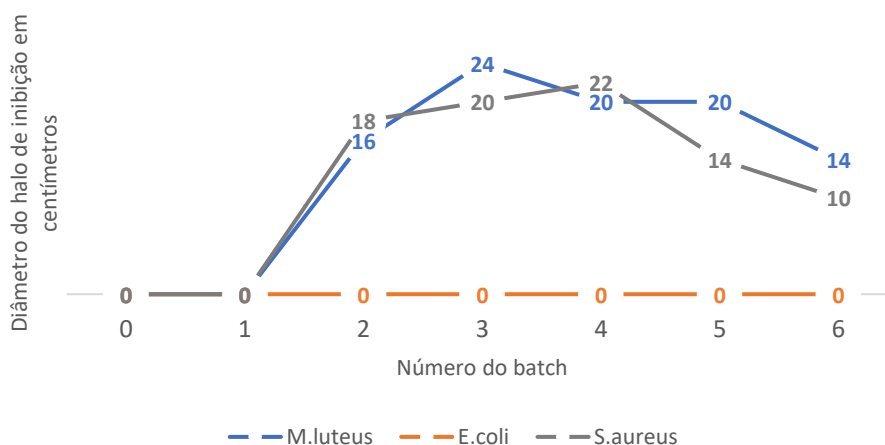
Partindo para a atividade por *batch*, verifica-se que o pico de atividade para o isolado S117B ocorreu no *batch* 2, uma vez que é neste ponto que se verifica dimensões do halo de inibição maiores, tanto para o *M. luteus* como para o *S. aureus*. Relativamente ao *M. luteus*, no *batch* 1, 2 e 3 verifica-se um aumento por volta de 40% relativamente à ação antimicrobiana do sobrenadante antes da imobilização das células (*batch* 0) e, no caso do *S. aureus*, um aumento de 120% relativamente ao sobrenadante inicial (*batch* 0). A partir do *batch* 4 verifica-se um decréscimo da atividade antimicrobiana tanto para o *M. luteus* como para o *S. aureus* e até no *batch* 5 já não se verifica halo de inibição no caso do *S. aureus*.

Assim, esta técnica de imobilização permitiu apresentar melhores resultados de inibição contra duas bactérias alvo relativamente à incubação das células livres (*batch* 0), através do aumento do halo de inibição contra *M. luteus* e pela presença de halos de inibição contra *S. aureus*. Deste modo, a densidade bacteriana parece ser um fator regulador da expressão dos

compostos antimicrobianos produzidos pelo isolado S117B. Apesar de ter sido recuperada a atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, não foi possível verificar-se o mesmo para a *E. coli*, como foi registado no teste de co-inoculação. Como mencionado anteriormente, diferentes condições de cultura permitem a produção de diferentes compostos antimicrobianos (Mercado & Olmos, 2022). Embora, tenham sido assemelhadas as condições de crescimento nesta técnica às do ensaio de co-inoculação, não foi possível fornecer as condições de cultura apropriadas para a indução da expressão dos compostos antimicrobianos contra Gram-negativas e, assim, não se verificou atividade contra *E. coli*. Este facto indica a produção de diferentes compostos antimicrobianos por parte do isolado S117B, em condições de expressão diferentes.

Tal como se verificou nos resultados do teste de co-inoculação, a ação antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas prevaleceu, sendo a *S. aureus* uma destas. O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um dos 12 patógenos listados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com prioridade na pesquisa de novos antibióticos. Para esta bactéria multirresistente estão a ser estudadas alternativas viáveis aos antibióticos, como é o caso das bacteriocinas produzidas por *Bacillus* (Liu *et al.*, 2022). Assim, estas atividades antimicrobianas registadas por *Bacillus* do CBA podem demonstrar potencial na pesquisa de novos compostos antimicrobianos tendo como alvo MRSA. Também, podem apresentar potencial no tratamento de infeções causadas por outras estirpes de *S. aureus* infecciosas, tanto em humanos como em animais (Heinzinger *et al.*, 2023). No entanto, será necessário realizar outros ensaios destes compostos sobre as bactérias em causa, de modo a confirmar a sua ação antimicrobiana nestas.

Para o isolado S118E, foram obtidos os seguintes resultados (Figura 9).



**Figura 9** - Inibição de crescimento nas bactérias alvo no teste de difusão em agar pelo sobrenadante filtrado do isolado S118E em 50mL de LB.

Também, para este isolado verificou-se o aumento de atividade antimicrobiana relativamente ao *batch* 0. Verificou-se halos de inibição em *M. luteus* e em *S. aureus* e no caso da *E. coli* verificou-se uma diminuição na densidade bacteriana (dados não apresentados na figura). Isto, porque embora não se tenha verificado um halo de inibição (Figura 9), verificou-se uma zona com menor densidade bacteriana. Estas zonas apresentaram 4mm de diâmetro nos *batches* 3, 4 e 5 e 2mm de diâmetro no *batch* 6.

Neste isolado, o pico de atividade antimicrobiana encontra-se entre *batch* 3 e o *batch* 4. O *batch* 3 apresentou o maior diâmetro de inibição para o *M. luteus* e o *batch* 4 o maior diâmetro de inibição para o *S. aureus*. Também, foram nestes dois *batches* que se verificou uma maior zona de menor densidade de *E. coli* com 4mm de diâmetro. Relativamente ao *M. luteus*, no *batch* 3 verificou-se um aumento de 240% relativamente ao *batch* 0 e, para o *S. aureus*, verificou-se um aumento de 220% relativamente ao *batch* 0. A partir do *batch* 5 verificou-se um decréscimo da atividade antimicrobiana para o *S. aureus* e no *batch* 6 um decréscimo sobre o *M. luteus*.

Comparativamente com o isolado S117B, pode-se aferir que o isolado S118E apresentou mais atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias alvo. Para o isolado S118E, o pico de inibição contra *M. luteus* foi 4mm superior e contra *S. aureus* foi 10mm superior ao pico de inibição do S117B. Também, verificou-se que a atividade antimicrobiana ao longo dos *batches* foi mais elevada em S118E, sendo que, a partir deste passo, este isolado foi o selecionado para caracterização das moléculas ativas.

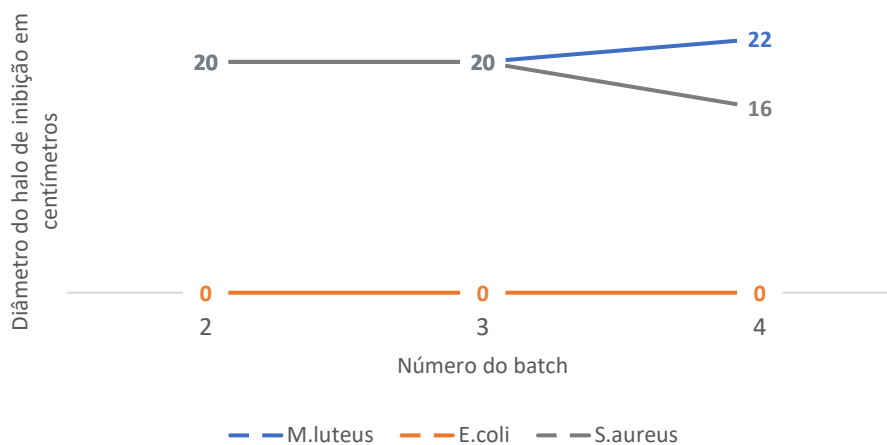
Da mesma forma que o isolado anterior, a imobilização das células permitiu aumentar a atividade inibitória contra as duas bactérias alvo relativamente à incubação das células livres, mas não recuperou a inibição contra a *E. coli* registada no teste de co-inoculação, indicando para compostos diferentes. Este isolado regula, da mesma forma, a produção de compostos antimicrobianos através dos mecanismos de *quorum sensing*, por apresentaram um aumento da atividade quando colocadas as células em maior densidade. Dada a elevada atividade antimicrobiana, este isolado também demonstra potencial na pesquisa de compostos antimicrobianos como alternativa no tratamento de infeções causadas por *S. aureus*.

### **3.3.3. Aumento da Produção de Sobrenadante com Imobilização do Isolado S118E**

Num primeiro ensaio, com base nos resultados obtidos para o isolado S118E, ampliou-se a produção de sobrenadante após a imobilização das células para 100mL de cultura para cada um dos 3 *erlenmeyers*, respeitando proporcionalmente as medidas utilizadas previamente. Realizou-

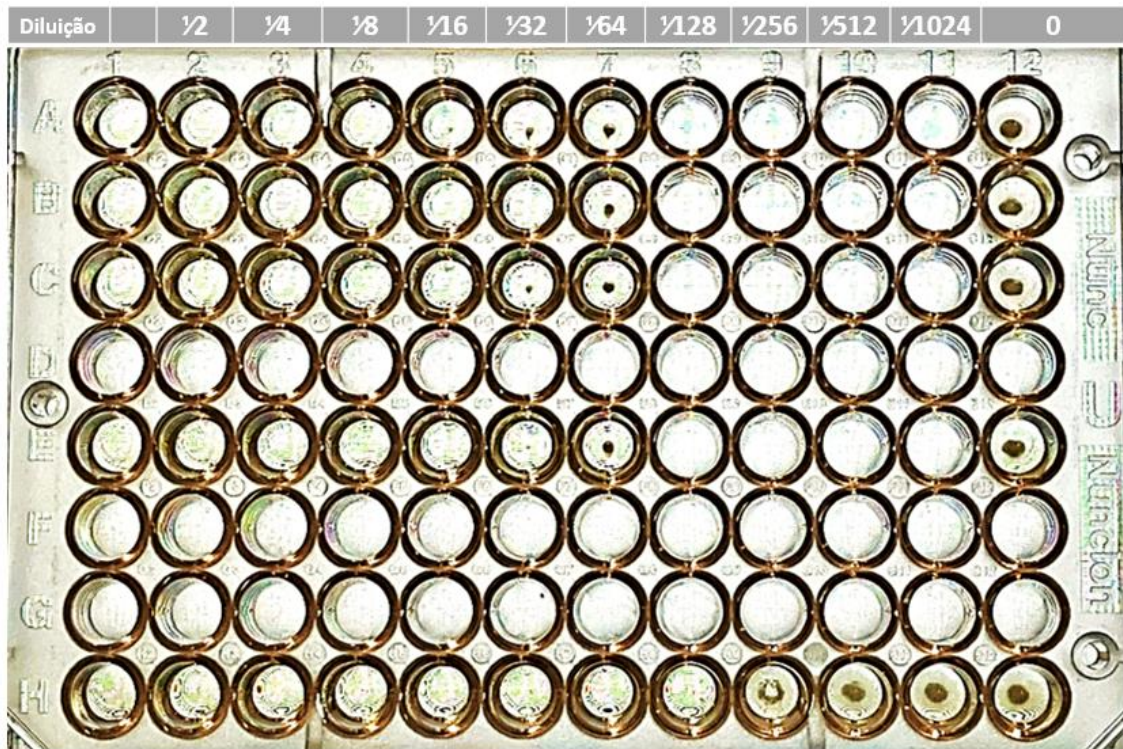
se as mudanças das *beads* até ao *batch* 5, uma vez que a partir deste observou-se decréscimo da atividade antimicrobiana, dando mais ênfase aos *batch* 2, 3 e 4 por coincidirem com o pico de atividade antimicrobiana para o isolado S118E.

Foram avaliados os sobrenadantes dos *batch* 2, 3 e 4 em placas de agar mole (Figura 10), juntamente com os testes em microplaca que permitiram obter um resultado mais específico da atividade antimicrobiana, na medida em que indicaram a partir de qual diluição o composto deixou de apresentar atividade.



**Figura 10** - Inibição de crescimento nas bactérias alvo no teste de difusão em agar pelo sobrenadante filtrado do isolado S118E em 100mL de LB.

Os resultados apresentados para as culturas de esferas em 100mL de meio foram semelhantes à cultura anterior em 50mL de meio, considerando algumas oscilações nos valores (Figura 10). O pico de atividade antimicrobiana foi atingindo pelo *batch* 3 com 20mm de halo de inibição tanto para *M. luteus* como para *S. aureus*, verificando um aumento de 2mm em *M. luteus* e um decréscimo de 2mm em *S. aureus* no *batch* 4. Além disso, a atividade sobre *E. coli* manteve-se, apresentando zonas menos densas com as mesmas medidas registadas anteriormente. Assim, a alteração dos volumes de produção não manifestou diferenças na atividade antimicrobiana sobre as bactérias alvo.



**Figura 11** - Avaliação da atividade antibacteriana em *S. aureus* pelo método de diluição em microplaca representado pela Tabela 6. A – Batch 2; B – Batch 3; C – Batch 4; D – vazio; E – Controlo Batch 3 dos 50mL de produção; F e G – vazio; H – ampicilina 50µg/mL. Os poços 8-11 das filas A, B, C e E estão vazios.

**Tabela 6** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para os batches 2, 3 e 4 resultantes do inóculo de beads em 100mL de meio LB. Controlo da atividade com uma alíquota do batch 3 da produção em 50mL LB e uma alíquota de ampicilina a 50µg/mL: (X) – poço não usado. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Batch 2								X	X	X	X	
Batch 3								X	X	X	X	
Batch 4								X	X	X	X	
Controlo batch 3								X	X	X	X	
Ampicilina 50µg/mL												

A Tabela 6 é um esquema ilustrativo do método de diluição em meio líquido realizado em microplaca para determinar as unidades de medida arbitrárias (AU) de cada amostra. Neste ensaio foram utilizadas as mesmas amostras dos *batches* testadas, anteriormente, em placas de agar mole. Neste teste utilizou-se uma alíquota do sobrenadante do *batch* 3 produzido em 50mL de meio como controlo de atividade antimicrobiana e 100µL do antibiótico ampicilina na concentração de 50µg/mL, também como controlo. Note-se que tanto o controlo de crescimento como o controlo do meio de cultura apresentaram os resultados desejáveis.

Os resultados demonstram que a atividade antimicrobiana sobre o *S. aureus* atingiu o seu pico no *batch* 3, uma vez que foi a amostra que apresentou mais atividade com 320 AU, mais atividade que o controlo utilizado do mesmo *batch* (*batch* 3 da produção com 50mL), 160 AU. O valor mais baixo foi de 80 AU para o *batch* 2 e o valor mais elevado foi a ampicilina (50µg/mL) com concentração inibitória mínima (MIC) de 0,39µg/mL. Este ensaio, para além de fornecer mais informação, mostra-se mais preciso, comparativamente ao ensaio de difusão em placas de agar mole. Para as mesmas amostras observou-se que o pico de atividade foi registado no *batch* 3, com algumas discrepâncias nos resultados entre os *batch* 2 e 4. Assim, a avaliação da atividade antimicrobiana, deste passo a diante, foi efetuada apenas através do método de diluição.

Num segundo ensaio, recorrendo à mesma técnica para produção otimizada de sobrenadante com atividade antimicrobiana em 100mL de LB, foram registados os seguintes resultados (Tabela 7).

**Tabela 7** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para os *batches* de 0 a 5 resultantes do inóculo de beads em 100mL pela segunda vez em meio LB. Controlo com uma alíquota de ampicilina a 50µg/mL. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Batch 0												
Batch 1												
Batch 2												
Batch 3												
Batch 4												
Batch 5												
Ampicilina 50µg/mL												

Na Tabela 7 pode-se observar a evolução do aumento da atividade antimicrobiana ao longo dos *batches*, tendo como comparação a atividade antimicrobiana da ampicilina à concentração de 50µg/mL. Verifica-se, em primeiro lugar, que o *batch* 0 não apresenta atividade antimicrobiana capaz de inibir o crescimento bacteriano. No entanto, com base da densidade ótica (OD) a 600nm de absorvância do primeiro poço, registou-se o valor de 0,263, muito menor que o controlo de crescimento bacteriano no 12º poço de 1,636, para a mesma DO. Ou seja, verificou-se uma redução do crescimento, mas não a sua total inibição. De seguida, verifica-se o aumento da atividade até ao *batch* 2 e 3 com 160 AU, correspondendo este momento ao pico de atividade antimicrobiana para o *S. aureus*. Após o pico, a atividade diminui no *batch* 4 e 5 para 80 AU. A ampicilina apresentou mais atividade antimicrobiana, com MIC de 0,78µg/mL, que os compostos produzidos pelo isolado S118E imobilizado em esferas de agar com 640 AU.

Em suma, esta técnica demonstrou-se reprodutível, na medida em que estes resultados se assemelharam aos anteriores em termos de AU, considerando algumas variações. Também, os resultados foram de encontro ao que se verificou em Alkhalili *et al.* (2016). Quando as células são imobilizadas em maior densidade, através dos mecanismos de *quorum sensing*, induz-se a expressão de compostos antimicrobianos. Assim, foi possível recuperar a atividade contra *S. aureus* e aumentar a atividade contra *M. luteus*.

### 3.4. Concentração e Fracionamento dos Sobrenadantes

Foram escolhidos os *batches* 2, 3 e 4 com mais atividade antimicrobiana das produções em 100mL de meio LB para dar continuidade à caracterização destes compostos. Inicialmente, os sobrenadantes foram concentrados de um volume original de 50-40mL para um volume final de 5-4mL, concentrando-os 10 vezes. Este processo é essencial para detetar a atividade antimicrobiana no material diluído pelos processos de fracionamento e purificação.

Nos processos de fracionamento foram utilizados os dispositivos de ultrafiltração por centrifugação *Centricon* com membrana de 10kDa (exclusão molecular) e reações de precipitações com sulfato de amónio a 70%, acetonitrilo e acetona. Destes processos, surgiram várias frações, que foram filtradas por membrana 0,2µm e testadas em microplaca (Tabela 8).

Processos	Frações
<i>Centricon</i> 10kDa	Eluído (<10kDa) Retentado (>10kDa)
Sulfato de amónio 70%	Precipitado Sobrenadante
Acetonitrilo	Precipitado Sobrenadante
Acetona	Precipitado Sobrenadante Sobrenadante otimizado

**Tabela 8** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para as frações resultantes dos processos de fracionamento: Prec – Precipitado, Sob. – Sobrenadante, Sob. Acetona otim. – Sobrenadante da precipitação com acetona otimizado concentrado em 50 vezes, Sob Concentrado 10x – sobrenadante concentrado em 10 vezes. Controlo com uma alíquota do batch 3. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Eluído												
Eluído C 200:800												
Retentado C 200:800												
Prec. Sulfato Amónio												

Sob. Sulfato Amónio												
Prec. Acetonitrilo												
Sob. Acetonitrilo												
Pre. Acetona												
Sob. Acetona												
Sob. Acetona otim.												
Controlo <i>batch</i> 3												
Sob. 10x												

Relativamente às frações do *centricon*, o eluído, com compostos inferiores que 10kDa, apresenta o dobro da atividade do retentado, com compostos superiores que 10kDa, com 320 AU e 160 AU respetivamente. Em primeiro lugar, é possível que a atividade registada no retentado seja resultante do mesmo composto presente no eluído em menor concentração, dado que este possa ter ficado retido por interações moleculares ou pela viscosidade do retentado. Em segundo lugar, o isolado possa produzir compostos distintos com tamanhos moleculares diferentes e com a mesma atividade antimicrobiana, na qual os compostos superiores a 10kDa sejam menos eficazes que os outros. De facto, apesar da vasta diversidade de compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus*, a maioria das bacteriocinas encontram-se na categoria dos lantibióticos apresentando, assim, tamanhos moleculares inferiores a 5kDa (Abriouel *et al.*, 2010 ; Basi-Chipalu *et al.*, 2022; Mercado & Olmos, 2022). Ou seja, existe maior probabilidade de que o composto verificado neste ensaio seja menor que 10kDa.

A precipitação com o sulfato de amónio não se mostrou relevante, porque nenhuma das frações demonstrou atividade antimicrobiana. As frações obtidas com os outros métodos de precipitação apresentaram atividade, sendo que, em ambos os casos, o precipitado apresentou menos atividade que o sobrenadante. O precipitado do acetonitrilo apresentou 20 AU e o sobrenadante 1280 AU, já o precipitado da acetona apresentou 80 AU e o sobrenadante 1280 AU.

As frações do eluído bruto, do sobrenadante do acetonitrilo e do sobrenadante da acetona, não otimizado, apresentaram 1280 AU. Uma vez com a mesma atividade, efetuaram-se medições a 280nm no Nanodrop de modo a distinguir, através da concentração de proteína nas amostras, qual das frações apresentava menor concentração de proteínas. A amostra do sobrenadante da precipitação com acetona foi considerada a mais purificada com uma concentração de 48mg/mL, distinguindo-se do sobrenadante do acetonitrilo com 81mg/mL e do eluído do *centricon* com 80mg/mL. Assim, a precipitação com acetona foi escolhida como o processo de fracionamento mais eficaz. Após otimização deste processo, verificou-se um aumento da atividade antimicrobiana no sobrenadante para 10240 AU. Este sobrenadante apresenta mais atividade

que a amostra de controlo do batch 3 com 160 AU e que os sobrenadantes 10 vezes concentrados (sob. 10x) com 2560 AU.

Este método de precipitação com acetona já foi descrito como eficaz na purificação de bacteriocinas e, até, como o mais eficaz entre outros métodos de precipitação demonstrando, através de testes de ação antimicrobiana, alta especificidade e altas taxas de purificação (Jumana *et al.*, 2004 e Zou *et al.*, 2018). Assim, considerando o tamanho reduzido do composto com atividade antimicrobiana e o sucesso da purificação com acetona, é possível que o composto em causa seja uma bacteriocina, ou seja um composto AMP sintetizado por via ribossómica. Também, o facto de manter a atividade antimicrobiana durante o processo de precipitação com acetona demonstra a natureza hidrofóbica do composto, indicando para a mesma possibilidade (Aunpad *et al.*, 2007).

### 3.5. Teste de Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica é usada na caracterização dos compostos BLIS. Num primeiro caso, foi utilizado o sobrenadante 10 vezes concentrado diluído na proporção 200:800 para tampão fosfato 10mM a pH 7,4, e, num segundo caso, utilizado o eluído do *centricon* diluído da mesma forma. O produto eluído foi selecionado posteriormente para eliminar a possibilidade de conter enzimas produzidas pela própria bactéria, com tamanho molecular maior que 10kDa, enviando os resultados da ação da temperatura.

Utilizando o sobrenadante concentrado em 10 vezes, foram colocadas as amostras durante 1 hora de 50°C até 100°C, com intervalos de 10°C, e sob um ciclo de 15 minutos de esterilização ao autoclave.

**Tabela 9** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para ensaio de estabilidade térmica: Sob. 10x – sobrenadante concentrado em 10 vezes. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Sob. 10x												
50°C												
60°C												
70°C												
80°C												
90°C												
100°C												
121°C												

Verifica-se pela Tabela 9 que o composto com atividade antimicrobiana é termolábil, ou seja, perde as suas propriedades quando exposto à temperatura. O sobrenadante concentrado 10 vezes apresenta 5120 AU, deste modo, este produto diluído 5 vezes apresenta por volta de 640 AU. A exposição de 1 hora a 50°C apresenta 80 AU, a 60°C apresenta 40 AU e a 70°C apresenta 20 AU. A atividade antimicrobiana perdeu-se partir dos 80°C. Assim, à medida que a temperatura aumentou, os compostos foram perdendo as suas propriedades.

Posto estes resultados, o eluído do *centricon* foi exposto ao longo do tempo a diferentes temperaturas de modo a verificar, até que momento a dada temperatura, o composto manteve a sua atividade. Estes tempos de exposição foram escolhidos com base no ensaio anterior e na utilidade de certas temperaturas, como por exemplo, a temperatura de incubação e corporal humana (37°C), a temperatura de incubação com enzimas (50°C), temperatura de inativação das enzimas (100°C), entre outras temperaturas intermédias.

Neste teste (Tabela 10), não foi executada uma diluição seriada, como se verifica nos outros testes em microplaca, à exceção da amostra do eluído e do eluído 200:800 que serviram como controlos (região superior da tabela). Apenas foi inserido 100µL da amostra correspondente a cada poço a 100 µL de meio LB (diluindo para 1/2, região inferior da tabela).

**Tabela 10** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para o teste de estabilidade térmica com a exposição do eluído na proporção de 200:800 ao longo do tempo a diferentes temperaturas. A região superior da tabela segue as diluições superiores e a região inferior da tabela segue as diluições inferiores. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Eluído												
E. 200:800												
Diluição		1/2										0
37°C		3h	6h	9h	15h	18h	24h	48h				
50° C		1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h	6h	8h	15h		
60° C		1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h	6h	8h	15h		
80° C		10m	20m	30m	40m	50m						
100° C		1m	2m	5m	10m							

Verifica-se que a 37°C a amostra mantém atividade até às 6 horas de exposição, sendo que até às 9 horas de exposição houve a perda de atividade. Para os 50°C, verificou-se atividade após 1 hora e meia de exposição, perdendo atividade até às 2 horas de exposição. No caso dos 60°C, de acordo com o teste anterior, verificava-se atividade após 1 hora de exposição, no entanto, neste teste não se verifica atividade após 1 hora e meia, perdendo atividade entre estes

intervalos de tempo. Para os 80°C fez-se intervalos de 10 minutos entre cada exposição podendo se verificar que a atividade se perdeu entre os 20 e os 30 minutos de exposição e, por fim, para os 100°C verificou-se a perda de atividade entre os 5 e os 10 minutos de exposição. À parte dos resultados apresentados, verificou-se, também que o composto perde a sua atividade após ser mantido a temperatura ambiente, por volta de 20°C, por 54 horas.

Estes dados foram utilizados para adaptar o ensaio de sensibilidade à ação enzimática. O tempo de incubações com enzimas a 50°C poderia atingir até 1 hora e meia e a inativação destas a 100°C poderia atingir até 5 minutos.

De forma geral, algumas bacteriocinas produzidas por *Bacillus sp.* apresentam elevada resistência térmica mesmo a longos períodos sob ebulição (100°C por 30 minutos) e até mesmo sobre a ação de um ciclo de esterilização (121°C por 15 minutos), sendo este último caso para uma bacteriocina produzida por *B. pumilus* (Aunpad *et al.*, 2007 e Berić *et al.*, 2013). No entanto, de acordo com o estudo de Kindoli *et al.* (2012) onde foi estudada a bacteriocina *Bac W42* com 5,4kDa, produzida por *Bacillus subtilis*, no qual verificaram-se características térmicas semelhantes aos resultados obtidos, considerando o composto moderadamente estável em termos de temperatura, podendo até suportar as temperaturas de pasteurização. Para uma exposição de 15 minutos, este composto antimicrobiano manteve atividade aos 50°C, mas perdeu metade da sua atividade a partir dos 60°C até aos 80°C. Também, perdeu quase toda a atividade quando exposta a 100°C por 10 minutos.

Pode-se concluir que o composto com atividade antimicrobiana apresenta natureza proteica por ser degradado com o aumento da temperatura e da exposição sobre esta. Também, apresenta características de estabilidade térmica semelhantes a bacteriocinas produzidas por *Bacillus*. Este é mais um aspeto que indica para a possível produção de bacteriocinas pelo isolado S118E.

### 3.6. Teste de Sensibilidade à Ação Enzimática

Ao teste de estabilidade térmica, seguiu-se o teste à sensibilidade da ação enzimática. Neste teste foi testado o eluído do *centricon* diluído na proporção de 200:800 com tampão fosfato e foram utilizadas 3 enzimas: proteinase K, tripsina e subtilisina A.

A proteinase K e a tripsina foram testadas às concentrações de 1, 2 e 5 mg/mL e a *subtilisina* A foi apenas testada à concentração de 5 mg/mL. As incubações de 50°C tiveram a duração de 1

hora. Já as incubações de 37°C tiveram a duração de 2 horas, à exceção das incubações da tripsina a 1 e 2 mg/mL que duraram 1h. A Tabela 11 ilustra os resultados destes ensaios.

**Tabela 11** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para o ensaio de sensibilidade à ação enzimática: C. – Controlo, PK – Proteinase K, S – Subtilisina, T – tripsina, 1, 2 e 5 – representa a concentração utilizada de cada enzima ou de tampão nos controlos. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. O rosa indica as reações com proteinase K e controlos. O verde indica a reação com subtilisina A e controlo. O azul indica as reações com tripsina e controlos. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
E. 200:800												
PK 1												
PK 2												
PK 5, 37°C												
PK 5, 50°C												
C. PK 1												
C. PK 2												
C. PK 5, 37°C												
C. PK 5, 50°C												
S 5												
C. S 5												
T 1												
T 2												
T 5												
C. T 1												
C. T 2												
C. T 5												

Os resultados indicam que o composto com atividade antimicrobiana é degradado pela Proteinase K à concentração de 5mg/mL durante 1 hora a 50°C, comparando com o respetivo controlo sob as mesmas condições com 40 AU de atividade. A atividade antimicrobiana, no entanto, não foi degradada pelas outras reações de digestão enzimática, isto porque as bacteriocinas apresentam sensibilidades diferentes em relação às enzimas.

O facto de o composto ter perdido atividade quando submetido a enzimas proteolíticas indica-nos que será de origem proteica, sendo este um critério na caracterização de compostos BLIS. Tendo em conta a bibliografia, alguns compostos peptídicos com atividade antimicrobiana só se apresentaram sensíveis quando expostos a concentrações mais elevadas de enzimas, concentração de 5mg/ml, como foi observado neste ensaio (Lei *et al.*, 2020), apesar da grande parte dos estudos verificarem sensibilidades completas às concentrações de 5µg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL e 2,5mg/mL (Anthony *et al.*, 2009; Motta & Brandelli, 2002; Alkhalili *et al.*, 2016 e

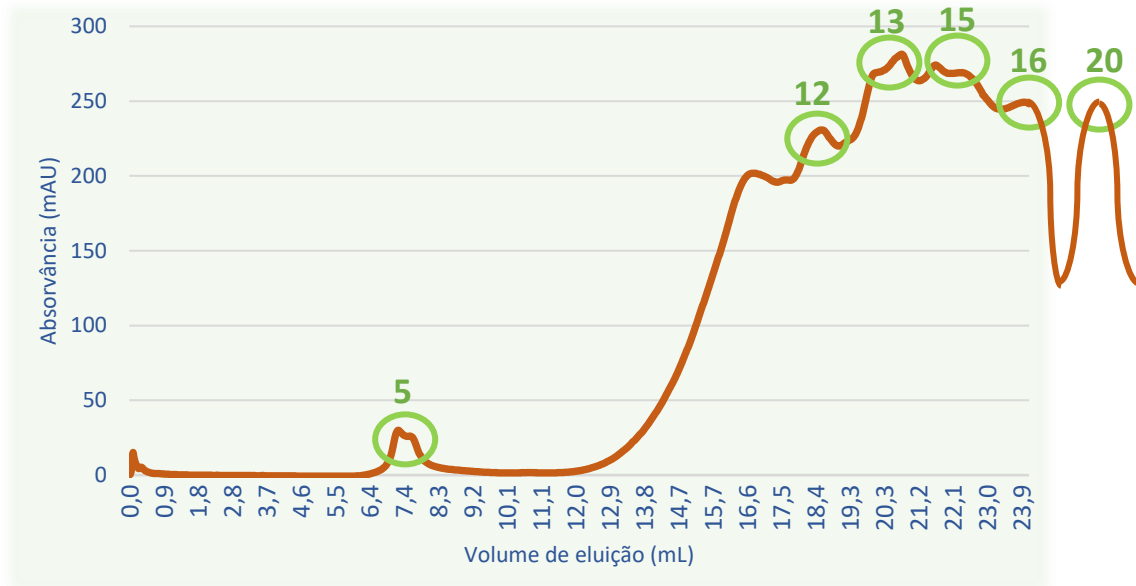
Karagiota *et al.*, 2021). No entanto, o estudo de Cladera-Olivera *et al.* (2004) chegou até a utilizar concentrações de 10mg/mL.

Também, nem todas as enzimas são capazes de digerir estes compostos peptídicos devido à sua pequenez ou às suas modificações pós-tradução, são necessários reconhecer locais de clivagem específicos para certa proteína e, quando estes não estão presentes, é mantida a atividade antimicrobiana. No caso da proteinase K, são reconhecidas sequências de aminoácidos mais pequenas, fazendo com que seja possível clivar a molécula e detetar a perda de atividade antimicrobiana. Para as outras enzimas, não foram reconhecidos locais de corte, mantendo-se o péptido intacto, logo mantendo-se a atividade. Isto varia entre moléculas, enquanto umas são sensíveis apenas para a proteinase K (Kindoli *et al.* (2012), outras podem ser à pronase E (Berić *et al.*, 2013), ou à lípase (Karagiota *et al.*, 2021) e, em alguns raros casos, a nenhuma enzima, como é o causa da bacteriocina *Bac-GM17* produzida por *Bacillus clausii* (Mouloud *et al.*, 2013). Assim, a degradação apenas por parte da proteinase K confirma a pequena dimensão do péptido antimicrobiano em causa, como mencionado anteriormente.

### **3.7. Purificação por *Superdex Peptide*, C18 Fase Reversa e FPLC**

#### **3.7.1. Cromatografia em Gel**

Inicialmente, procedeu-se ao fracionamento pela cromatografia em gel usando a coluna *Superdex peptide 10/300 GL (Cytiva)*. Com a injeção da amostra do sobrenadante resultante da precipitação com acetona otimizado, 50 vezes concentrado, nesta coluna foi obtida uma primeira cromatografia na qual foram testadas 6 frações pelo método de diluição em meio líquido. Estas frações correspondem a picos diferentes assinalados na Figura 12, à exceção da 20ª fração que foi eluída após o registo da cromatografia em causa.



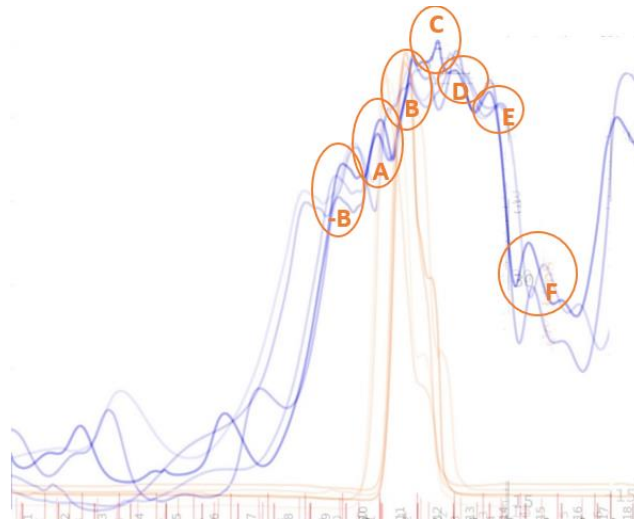
**Figura 12** - Cromatograma obtido na primeira cromatografia de gel com a Superdex peptide 10/300 GL. Em destaque as frações 5, 12, 13, 15, 16 e 20 para fins de teste à atividade antimicrobiana.

**Tabela 12** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para as frações assinalados na primeira cromatografia de gel: F- fração, Sob. Acetona otim. - Sobrenadante da precipitação com acetona otimizado concentrado em 50 vezes. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
F. 5												
F. 12												
F. 13												
F. 15												
F. 16												
F. 20												
Sob. Acetona otim.												

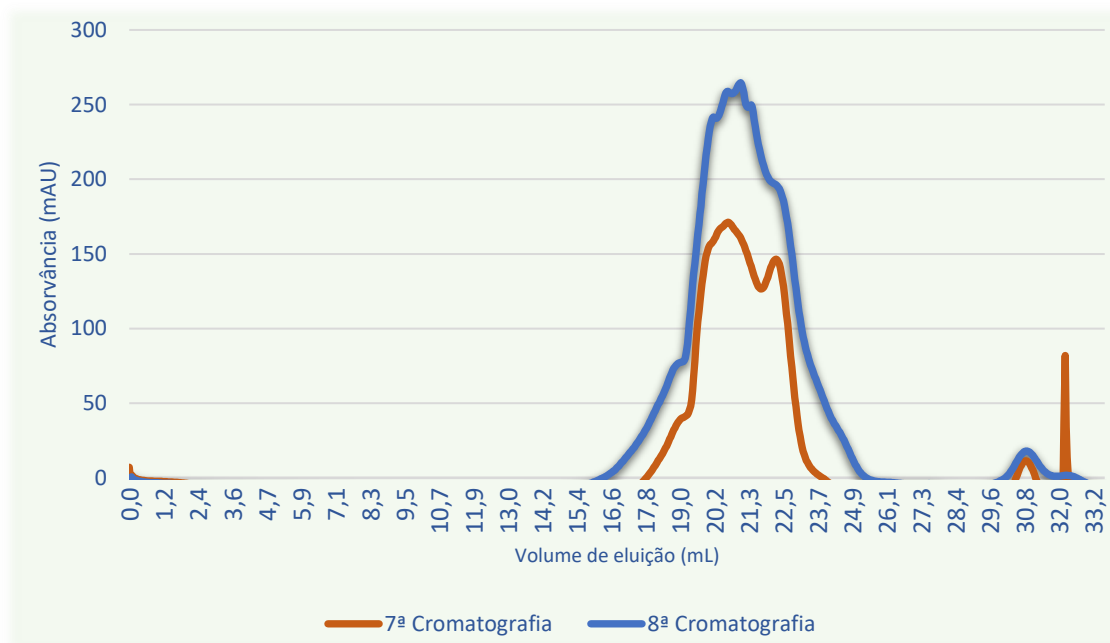
Na Tabela 12 observa-se que a fração com mais atividade antimicrobiana foi a 16ª com 320 AU, pelos 24mL de eluição, representando o 6º pico. Observa-se um aumento da atividade desde os 20mL de eluição até esta fração e no 7º pico, correspondendo a 20ª fração, deixa de se verificar atividade. Este aumento da atividade ao longo das frações pode indicar o início da eluição do composto com atividade antimicrobiana presente na 16ª fração, como pode indicar para a presença de outros compostos com menor atividade que foram eluídos primeiro.

Posteriormente, executaram-se mais 5 cromatografias com o fim de recolher mais quantidade de cada pico representado. Nestes, foram criados grupos consoante as regiões dos picos em causa, -B, A, B, C, D, E, como demonstrado pela Figura 13.



**Figura 13** - Cromatogramas obtidos desde a segunda à sexta cromatografia de gel com a Superdex peptide 10/300 GL com indicação dos picos selecionados.

Posto isto, o conteúdo concentrado correspondendo ao grupo C foi submetido a duas novas cromatografias com a mesma coluna, 7ª e 8ª cromatografia, com o objetivo de fracionar ainda mais os compostos desta amostra, obtendo a Figura 14 com a junção de ambas as cromatografias.



**Figura 14** - Cromatograma obtido na sétima e oitava cromatografia de gel com a Superdex peptide 10/300 GL do grupo de frações C.

As frações resultantes de ambas as cromatografias cingidas aos picos representados no centro do cromatograma não apresentaram atividade antimicrobiana. No entanto, verificou-se valores de densidade ótica menores para os primeiros poços da microplaca indicando para uma redução no crescimento bacteriano. Esta quebra de atividade pode dever-se às inúmeras manipulações que a amostra sofreu ao longo do tempo ou por se ter analisado o grupo C associado à 15ª fração no lugar do grupo D associado a fração que apresentou mais atividade, a 16ª fração (Figura 13). Para entender esta perda de atividade, analisou-se o sobrenadante e o pellet resultante de centrifugação do grupo D, sem ser submetido a uma nova cromatografia, pelo método de diluição em microplaca (Tabela 13).

**Tabela 13** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para o grupo de frações D, sobrenadante e precipitado: Sob. - Sobrenadante da centrifugação. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Pellet D1												
Pellet D2												
Sob. D1												
Sob. D2												

Confirma-se a presença de atividade antimicrobiana no grupo de frações D, por volta dos 21 a 22 minutos de eluição, resultante da concentração das frações análogas de 5 cromatogramas. O composto com atividade antimicrobiana, ao ser eluído após este volume através da coluna *Superdex peptide*, indica para um composto com peso molecular baixo. Considerando os resultados obtidos de Kumar & Aradhyam (2014), recolheram-se péptidos com tamanho molecular compreendido entre 1,7 e 2,62kDa sob as mesmas condições de cromatografia. Estas características apresentam-se a favor da presença de péptidos antimicrobianos de baixo peso molecular produzidos pelo isolado S118E (Aunpad *et al.*, 2007).

### 3.7.2. Cromatografia de Fase Reversa - C18

Num primeiro ensaio, foram utilizadas as *Spin Columns*, com resina *Pierce C-18* (Tabela 14), e, num segundo ensaio, a coluna adaptada a seringa, com 1mL de capacidade, empacotada com a mesma resina. Ambos os ensaios permitem fracionar as amostras do sobrenadante da precipitação com acetona otimizado concentrado 50 vezes.

**Tabela 14** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para os compostos resultantes da cromatografia de fase reversa com recurso as Spin Columns: A.C. – recolha do produto após carregar a amostra na coluna; C. 50x – controlo (sobrenadante 50 vezes concentrado); eluído - eluído com acetona a 100% e 1, 2 e 3 - número de lavagens da coluna. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
C. 50x												
A.C.												
1 Lavagem												
2 Lavagem												
3 Lavagem												
Eluído												

Grande parte da atividade antimicrobiana não ficou retida na coluna, saindo após ser carregada com 5120 AU. Apenas na primeira lavagem registou-se 20 AU que está associado à eliminação de alguns resíduos de amostra. Depois, verifica-se 5120 AU de atividade no produto eluído da coluna. Isto indica que o composto foi eficazmente retido pela resina C18, ou seja, apresenta as mesmas características hidrofóbicas que a resina de fase reversa, como já tinha sido observado pela precipitação com acetona (Aunpad *et al.*, 2007). No entanto, a atividade registada aquando da injeção da amostra indica para o efeito de sobrecarga da resina. Esta resina por sua vez não se encontra compactada, mas sim livre, dificultando a interação coluna-molécula.

Posto isto, utilizou-se a coluna compactada de resina C18 para melhorar a eficácia da purificação, eluindo com acetona a 100% numa primeira situação e otimizado, numa segunda situação, para a eluição com 4 percentagens de acetona: 15%, 30%, 60% e a 100% (Tabela 15). Estas diferentes eluições permitem aumentar a rentabilidade da purificação e, até mesmo, separar compostos com atividade antimicrobiana distintos.

**Tabela 15** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para os compostos resultantes da cromatografia de fase reversa com a coluna de 1mL de resina C18 compactada: A.C. – recolha do produto após carregar a amostra na coluna; C. 50x – controlo (sobrenadante 50 vezes concentrado); eluído único 100% - eluído com acetona a 100% de uma só vez (primeira situação); E. – Eluído com dada percentagem de acetona (segunda situação); 1 e 2 - número de lavagens da coluna (primeira situação). O rosa indica para os produtos da primeira situação. O azul indica para os produtos da segunda situação. O preenchimento a cinzento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

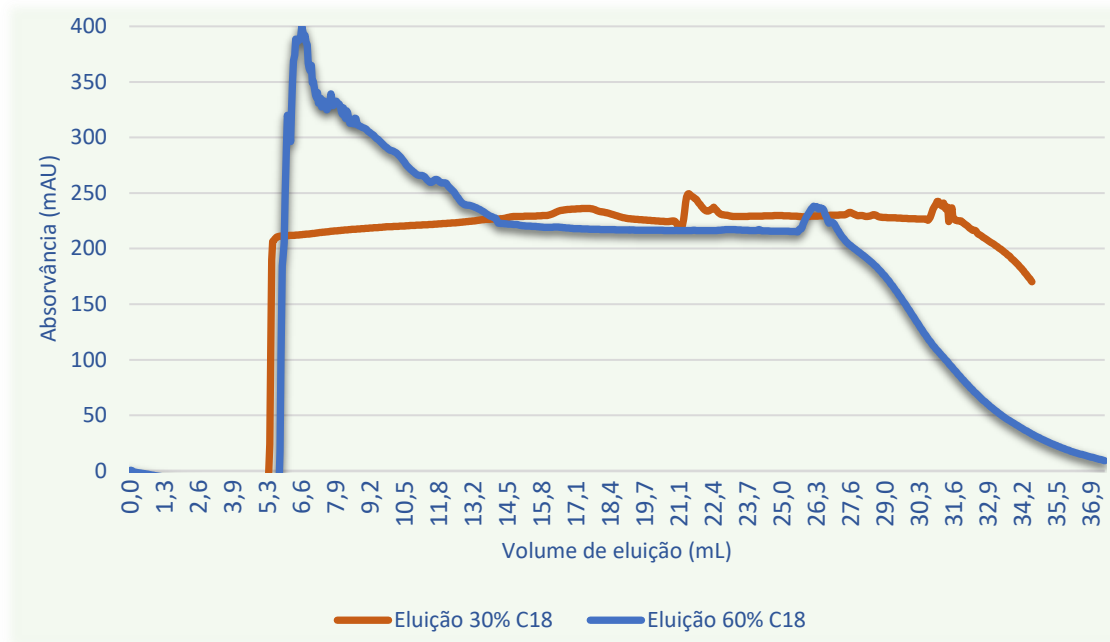
Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
C. 50x												
A.C.												
1 Lavagem												
2 Lavagem												

Eluído único 100%												
E. 15%												
E. 30%												
E. 60%												
E. 100%												

Na primeira situação, a otimização do processo conseguiu equilibrar a quantidade de amostra injetada para a quantidade de resina presente e foi recuperada quase toda a amostra através da eluição a 100% de acetona, apresentando 1280 AU. No segundo caso, foi possível dividir a atividade antimicrobiana pelas 4 percentagens de eluição com a acetona, com 15% apresentando 40 AU, 30% apresentando 640 AU, 60% apresentando 5120 AU e 100% apresentando 20 AU. O aumento da atividade antimicrobiana registada ao longo das diluições pode ser resultado da gradual eluição do composto antimicrobiano com mais atividade presente na fração 60%. Também, cada fração pode eluir compostos antimicrobianos distintos, sendo que o composto eluído a 15% apresenta menos atividade, 40 AU, o composto eluído a 30% apresenta atividade intermédia, 64 AU, e o composto eluído com 60% é o que apresenta mais atividade entre os restantes, 5120 AU. Para responder a esta questão, foram escolhidas as frações de 30% e de 60%, porque apresentaram mais atividade antimicrobiana e por serem as mais puras de entre as restantes. Estas amostras foram novamente fracionadas pelo processo de FPLC seguinte.

### 3.7.3. FPLC – Resource RPC 3mL

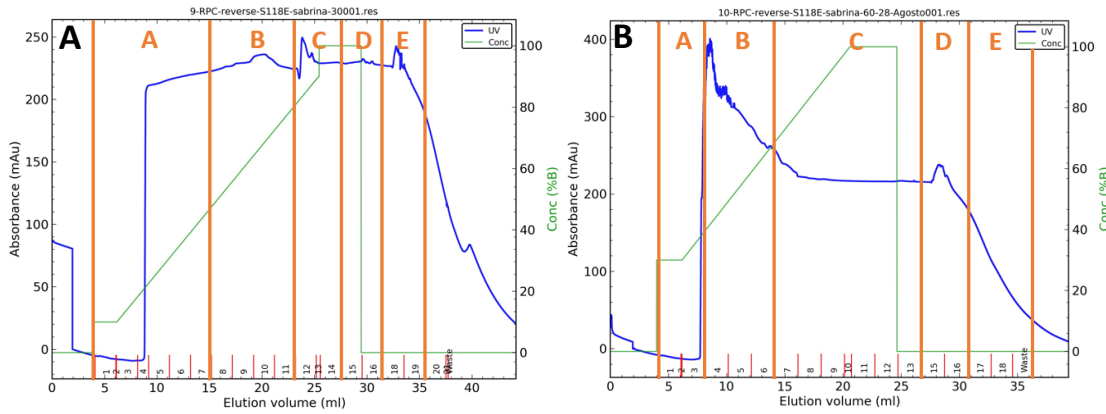
Deu-se continuidade com a cromatografia líquida, FPLC, utilizando a coluna de fase reversa Resource RPC (Cytiva) para as amostras mais puras e que apresentaram mais atividade, denominadas de 30% C18 e 60% C18. Foram executadas duas cromatografias, uma por amostra (Figura 15).



**Figura 15** – Cromatogramas obtidos na primeira e segunda cromatografia com a coluna Resource RPC, sistema de FPLC, das amostras 30% C18 e 60% C18.

Os picos não são muito visíveis em ambas as cromatografias, à exceção do 1º pico no cromatograma da amostra 60% C18. Somando às medições da quantidade de proteína registadas no Nanodrop, conclui-se que o composto proteico com atividade antimicrobiana em causa não é visível à absorvância de 280nm. Isto deve-se ao facto deste composto, como indica ser de pequeno peso molecular, poder apresentar um coeficiente de extinção molar baixo. Os aminoácidos (aa) com anéis aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) são os compostos mais detetados aos 280nm, enquanto as ligações duplas são também detetadas a 200nm. O número mais reduzido destes no péptido pode indicar para erros de leitura, também há a possibilidade de o composto em causa não ser proteico, e assim não conseguir ser detetado (Stoscheck, C. M., 1990).

Mesmo assim, foram agrupadas as frações de cada cromatografia em 5 grupos, A, B, C, D e E, filtrados por membrana e testados pelo método de diluição em microplaca. Neste ensaio verificou-se em que parte dos cromatogramas encontrava-se atividade antimicrobiana (Tabela 16). Estes grupos estão representados na Figura 16 em A e B com o cromatograma de cada amostra.



**Figura 16** - A Cromatogramas obtidos na primeira cromatografia de FPLC da amostra 30% C18 com indicação das frações selecionadas; B – Cromatograma obtido na segunda cromatografia de FPLC da amostra 60% C18 com indicação das frações selecionadas. A linha azul corresponde à absorvância a 280nm. A linha verde corresponde ao gradiente de acetona.

**Tabela 16** - Avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de diluição em meio líquido para os grupos de frações da 1ª cromatografia da amostra 30% C18 (indicado a rosa) e para a 2ª cromatografia da amostra 60% C18 (indicado a azul): 30% C18 e pellet 30% C18 – amostra e pellet da amostra eluída com 30% de acetona da coluna C18; 60% C18 e pellet 60% C18 – amostra e pellet da amostra eluída com 60% de acetona da coluna C18; A/B/C/D/E 30 – 5 grupos de frações da 1ª cromatografia da amostra 30% C18; A/B/C/D/E 60 – 5 grupos de frações da 2ª cromatografia da amostra 60% C18. O preenchimento indica crescimento bacteriano. A segunda coluna representa o controlo do meio de cultura e a última coluna o controlo de crescimento bacteriano.

Diluição		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
30% C18												
Pellet 30% C18												
A 30												
B 30												
C 30												
D 30												
E 30												
60% C18												
Pellet 60% C18												
A 60												
B 60												
C 60												
D 60												
E 60												

Registou-se atividade antimicrobiana para ambos os grupos de frações C resultantes das duas cromatografias: 40 AU em C 30 e 320 AU em C 60. A atividade registada de 20 AU na amostra B 60 pode indicar para o início da eluição do composto presente na amostra C 60 com 320 AU.

Na 1ª cromatografia da amostra 30% C18 verifica-se a eluição do composto em causa entre os 23 e 28 minutos de eluição quando o gradiente da acetona atingiu os 60%. Na 2ª

cromatografia da amostra 60% C18 a eluição do composto entre os 14 e 26 minutos de eluição quando o gradiente de acetona atingiu valores entre os 55% e os 100%, uma vez que este grupo é muito abrangente, não se consegue definir um ponto mais específico de eluição.

As alterações registadas no cromatograma nos outros grupos sem atividades podem indicar para impurezas da amostra, resultando em precipitados nos eppendorfs de reserva, como podem indicar para outros compostos secretados pelas bactérias para o sobrenadante que não apresentam atividade antimicrobiana. Como se pode verificar nos grupos C, mais evidentemente na 2ª cromatografia, não se registam alterações pela medição a 280nm para os compostos que apresentam atividade antimicrobiana, como mencionado anteriormente. No entanto, foi possível quantificar as proteínas presentes em ambas as amostras dos grupos C pelo *Pierce Kit BCA*, sendo que a amostra C 30 apresentou 0,05mg/mL e a amostra C 60 apresentou 0,10mg/mL (Tabela 17).

Os dados vão de encontro ao que se registou em Aunpad *et al.* (2007) com a presença de um pico aos 26 minutos pela bacteriocinas de 1994,62 Da produzida por *B. pumilus* ao ser utilizada a coluna C18-hypersil pelo sistema de HPLC. Este é mais uma característica que aponta a presença de péptidos antimicrobianos de baixo peso molecular nos sobrenadantes produzidos pelo isolados S118E.

### 3.8. Tabela de Purificação

Uma vez reunidas as amostras que foram utilizadas ao longo dos processos de fracionamento e purificação, foi contruída a tabela de purificação presente abaixo (Tabela 17):

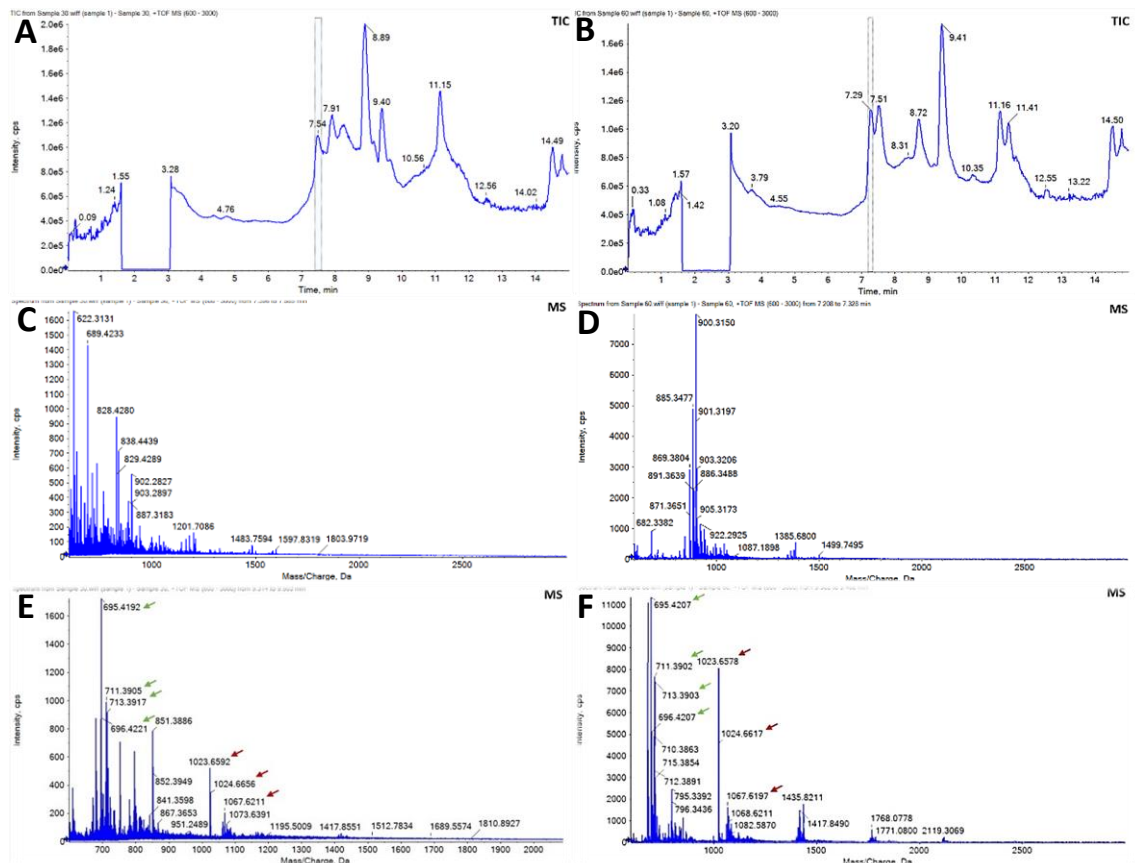
*Tabela 17 - Tabela de purificação do composto com atividade antimicrobiano contra S. aureus recuperado do sobrenadante de cultura.*

Frações	Volume (mL)	Atividade total (AU)	Proteína total (mg)	Atividade específica (AU/mg)	Fold de purificação	Recuperação (%)
Sobrenadante liofilizado 10x	5	25600	318,95	80	1	100
Sobrenadante precipitação com acetona otimizado	1	10240	74,31	138	1,73	40
Eluído C18 100%	1	1280	0,91	1407	17,59	5
Eluído 30% C18	1	640	0,29	2207	27,59	2,5
Eluído 60% C18	1	5120	0,29	17655	220,69	20
30% FPLC (C)	1	40	0,05	800	10	0,2
60% FPLC (C)	1	320	0,10	3200	40	1,3

Como pode-se verificar, ao longo do processo purificou-se a amostra como desejado até ao valor de concentração proteica mais baixo registado de 0,05mg/mL, enquanto aumentava-se a atividade específica ao longo do processo. A maior atividade específica registada foi para a amostra 60% C18 com 5120 AU/mg, com 0,29mg/mL de concentração proteica, registando-se um decréscimo quando executado o FPLC. Foi possível atingir um *fold* de purificação máximo de 220,69 com uma recuperação de 20% para a mesma amostra.

### 3.9. Espectrometria de Massa MALDI-TOF MS

Ambas as frações 30% C18 e 60% C18, resultantes da eluição com 30% e 60% de acetona da coluna C18, foram enviadas em alíquotas de 100µL e analisadas pelo Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade NOVA de Lisboa utilizando a espectrometria de massa MALDI-TOF MS. Foram obtidos os resultados da massa intacta para ambas as amostras.



**Figura 17** – Análise dos resultados de massa intacta das amostras 30% e 60% C18. As figuras à esquerda concernem à amostra 30% C18 e as figuras à direita às amostras 60% C18: A e B - cromatografias TIC (Total Ion Count); C e D - espectros para o tempo de retenção 7,54 minutos do cromatograma TIC; E e F - espectros para o tempo de retenção 9,4 minutos.

Através da Figura 17, em A foi destacado para o tempo de retenção de 7,54 minutos e em B destacado o tempo de retenção 7,29 minutos ambos com a intensidade de  $1,1 \times 10^6$  cps (*counts per second*).

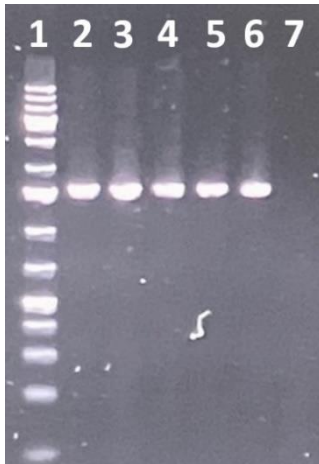
Tendo por base os espectros C e D conclui-se que ambas as amostras testadas estão enriquecidas em péptidos com baixo peso molecular compreendidos no intervalo de 600 a 2000 Da. No entanto, tendo por base o tempo de retenção de 7,54 minutos, são registados perfis peptídicos diferentes em que a amostra 30% C18 é enriquecida em péptidos com peso molecular entre 600 e 1000 Da e a amostra 60% C18 é enriquecida em péptidos com peso molecular entre os 1000 e 1400 Da.

Foram registados 7 picos que identificam para péptidos partilhados entre as duas amostras no tempo de retenção de 9,4 minutos, sendo que as suas massas se encontram no intervalo de 700 Da a 1024 Da. Em E e F encontram-se assinaladas estes péptidos com as setas verdes os que apresentam massas menores que 1000 Da e com as setas vermelhas os que apresentam as massas maiores que 1000 Da. Relativamente aos péptidos assinalados com seta vermelha e com 1024 Da estes encontram-se mais enriquecidos na amostra 60% C18.

De forma geral, as bacteriocinas encontram-se com tamanhos moleculares semelhantes ou menores que 30kDa (Zou *et al.*, 2018) e no caso das bacteriocinas produzidas por *Bacillus* estas apresentam baixa massa molecular, como são os casos da pumilicina com 1994,62 Da produzida por *B. pumilus*, bacticurina com 3160 Da, turicina 3162 Da e a coagulina com 3,4 Da (Aunpad *et al.*, 2007). No caso da plantazolicina, péptido RiPP com modificações pós-tradução, esta apresenta uma massa molecular média de 1336,4783 Da (Lee *et al.*, 2013), enquadrando-se dentro dos valores que foram obtidos, não deixando de mencionar que já há registo de produção deste composto por *Bacillus pumilus* (Molohon *et al.*, 2011), indicando para a possível existência da plantazolicina como composto antimicrobiano presente nos sobrenadantes do isolado S118E.

### 3.10. Amplificação e Sequenciação do Gene 16S da Bactéria S118E

Amplificou-se o gene 16S do isolado S118E utilizando os *primers* universais 1492R e 8F. Neste processo foi ajustada a temperatura de *anealing* de 50°C para 52°C, aproximando-se o máximo possível da temperatura de *melting* mais baixa registada neste conjunto de *primers*, que neste caso pertencia ao *primer* 1492R com temperatura de *melting* de 52,3°C.



**Figura 18** – Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação do gene 16S do isolado S118E: 1 - marcador molecular 1Kb Plus, 2 a 6 - S118E, em diferentes tubos de reação; 7 – controlo negativo.

Pela análise da Figura 18 conclui-se que a amplificação do gene 16S foi bem sucedida para todas as amostras, com o controlo negativo limpo de contaminações, apresentando bandas bem visíveis com peso molecular de 1500bp. Estas amostras foram concentradas e purificadas através do kit *DNA clean and concentrator*, apresentando uma concentração final de 38,9 ng/ $\mu$ L, e enviada para sequenciação no laboratório *STAB VIDA*.

A sequência consensus (Anexo II) foi obtida pelo programa *Bioedit*, com um comprimento de 1394 nucleótidos, e, através do programa de *Blast*, foram encontradas 100 homologias de 99,21% de indentidade, 0,0 *E-value* e 2516 de *score* máximo com três organismos: *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus zhangzhouensis* e com outras espécies do género *Bacillus* (Figura 19). Destes, a bactéria mais mencionado foi o *Bacillus pumilus* com 66 homologias, seguindo *Bacillus sp.* com 21 homologias, depois *B. zhangzhouensis* com 10 homologias e, por fim, com 3 homologias *B. safensis*. Assim, foi considerado o *Bacillus pumilus* como a espécie correspondente ao isolado S118E.

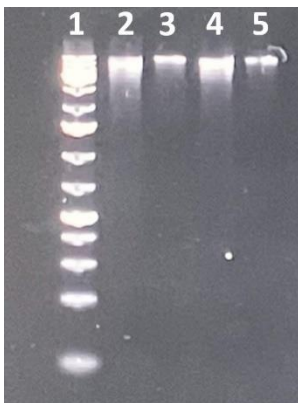
Description	Scientific Name	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Bacillus pumilus strain 3-19 chromosome</a>	<a href="#">Bacillus pumilus</a>	2516	99%	0.0	99.21%	3609444	<a href="#">CP054310.1</a>
<a href="#">Bacillus pumilus strain 93.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus pumilus</a>	2516	99%	0.0	99.21%	1438	<a href="#">MT044317.1</a>
<a href="#">Bacillus pumilus strain ACCC04450 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus pumilus</a>	2516	99%	0.0	99.21%	1453	<a href="#">MZ067893.1</a>
<a href="#">Bacillus pumilus strain Agri-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus pumilus</a>	2516	99%	0.0	99.21%	1407	<a href="#">MT102721.1</a>
<a href="#">Bacillus pumilus strain Agri-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus pumilus</a>	2516	99%	0.0	99.21%	1420	<a href="#">MT102722.1</a>

**Figura 19** - Resultados de homologia da sequência consensus do gene 16S do isolado S118E obtidos pelo programa de *Blast* (retirado de NCBI, acedido a 29 de outubro de 2023).

### 3.11. Sequenciação do Genoma do Isolado S118E

#### 3.11.1. Extração do DNA

Extraíu-se o DNA do isolado S118E utilizando o Kit *Quick-DNA Fungal/ Bacterial Miniprep* (Zymo Research), e analisou-se o mesmo através de uma eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 20).



**Figura 20** - Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA do isolado S118E extraído pelo Kit Miniprep. 1 - marcador molecular 1Kb Plus; 2 - amostra 1 (primeira eluição) 3 - amostra 2 (primeira eluição); 4 - amostra 1 (segunda eluição); 5 - amostra 2 (segunda eluição).

Observa-se que a amostra 1 demonstra ter mais quantidade de DNA, no entanto mais degradada, enquanto a amostra 2 apresenta menos quantidade de DNA, mas menos degradada. Foram obtidas concentrações entre 21,2 e 26,1 ng/ $\mu$ L, rácios 260/280 de 2,0 e rácios 260/230 de 0,03 pela absorvância de 260nm no Nanodrop. Pelo Qubit foram obtidos os valores de 20,7 e 16,8 ng/ $\mu$ L para a amostra 1 (1ª e 2ª eluição respetivamente) e de 7,48 e 3,36 ng/ $\mu$ L a amostra 2 (1ª e 2ª eluição respetivamente). Com base nos resultados, juntaram-se as amostras 1 e 2 da primeira eluição, obtendo 72 $\mu$ L de DNA com um conteúdo final de 1014ng, e enviou-se para sequenciação do genoma no laboratório *Novogene*.

#### 3.11.2. Genoma

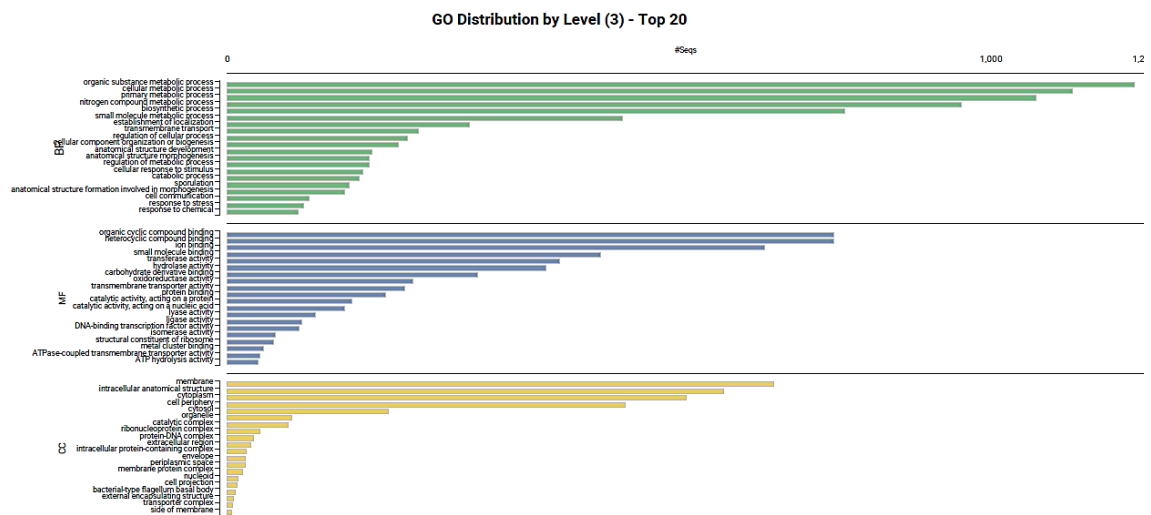
O genoma do isolado S118E, mais concretamente *Bacillus pumilus*, após aceite no controlo de qualidade, foi caracterizado e mapeado, apresenta um tamanho total de 3.640.519bp, com 41,6% do seu conteúdo GC, ao longo de 13 *contigs*, tendo o *contig* 1 grande parte da sequência do DNA. Nestes 13 *contigs* estão presentes 3480 genes e são codificadas 3375 proteínas.

Após ter sido assemblado as 15 milhões de *reads* com o genoma de referência *Bacillus pumilus* (*accession number* ASM302079v1 no *NCBI*) foram mapeadas 14 milhões delas, obtendo

uma percentagem de 90,85% de mapeamento. Do genoma em causa obteve-se uma cobertura (*coverage*) de 99,86%.

Em termos da distribuição de *Blast Hit's* nas proteínas codificadas, foram obtidas 2.021 sequências com *hit's* e 792 sequências sem *hit's*, indicando estas para novas proteínas produzidas por esta bactéria. No entanto, foram obtidos mais *hit's* com *Bacillus subtilis* (2000 *hit's*) do que com o *Bacillus pumilus* (500 *hit's*). Isto pode se dever ao facto dos genomas de *Bacillus pumilus* não estarem tão anotado quanto os genomas de *Bacillus subtilis* que são alvo de mais estudos.

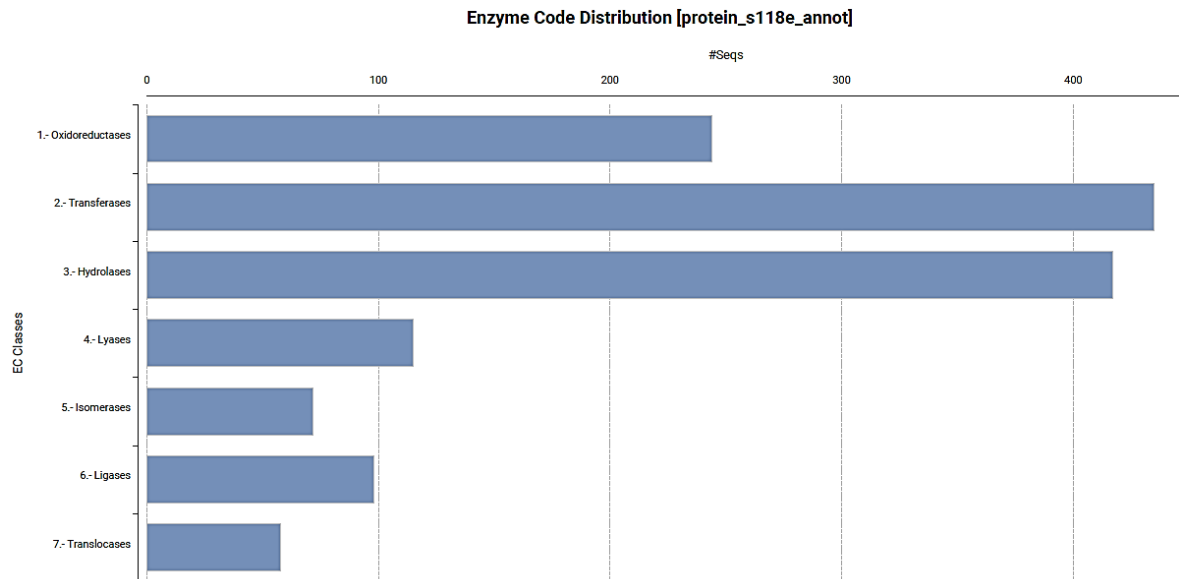
Na Figura 21 estão representados os principais termos usados na ontologia dos genes (*Gene Ontology*), também denominados de *Go terms*, que são os processos biológicos, a função molecular e os componentes celulares.



**Figura 21** - Distribuição dos *Go terms* por níveis: BP - processo biológico; MF - função molecular; CC - componente celular.

Relativamente aos processos biológicos, os processos metabólicos para substâncias orgânicas, os processos metabólicos celulares e os processos metabólicos primários, por ordem decrescente, foram os que apresentaram mais *Go terms*, todos eles superiores a 1000 sequências. Já sobre a ontologia relacionada com função molecular, os compostos de *binding* orgânicos cíclicos, os compostos de *binding* heterocíclicos e os iões de *binding*, também por ordem decrescente, foram os que apresentaram mais *Go terms*, apresentando por volta de 750 sequências. Por fim, sobre os *Go terms* relacionados com componentes celulares, na mesma ordem, os componentes membranares, os componentes de estrutura anatómica intracelular e

os componentes do citoplasma foram os que apresentaram mais GO *terms*, apresentando, também, por volta de 750 sequências.



**Figura 22** - Distribuição de códigos enzimáticos: 1 – oxidorreductases; 2 – transferases; 3 – hidrolases; 4 – liases; 5 – isomerases; 6 – ligases; 7 – translocases.

Em termos de sequências codificantes no genoma para os diferentes tipos enzimáticos, como se verifica pela Figura 22, as transferases encontram-se em primeiro lugar com quase 450 sequências, seguindo-se as hidrolases com pouco mais que 400 sequências e, depois, as oxidorreductases com 250 sequências. As outras categorias, liases, isomerases, ligases e translocases, apresentam um número de sequências próximo de 100.

O estudo de Freitas-Silva *et al.* (2021) sequenciou da mesma forma o genoma do *Bacillus pumilus* 64-1 obtendo um tamanho de 3,6Mpb dividido ao longo de 12 *contigs*, com 41,5% de conteúdo GC, 3705 sequências codificadoras. Os valores registados para o genoma do *Bacillus pumilus* em causa aproximam-se dos registados no referido estudo, confirmando assim a identificação da espécie do isolado S118E.

### 3.11.3. Mineração Genómica do Isolado *Bacillus pumilus*

Com o recurso ao antiSMASH foram executadas pesquisas nos 13 *contigs* para regiões produtoras de metabolitos secundários. No caso dos *contigs* de 5 a 13, à exceção do 9, não foram encontradas em nenhuma destas regiões *clusters* de genes produtores de metabolitos secundários. No entanto, para o *contig* 1 foram encontradas 7 vias metabólicas para a síntese de metabolitos secundários, 2 vias no *contig* 2, 1 via nos *contigs* 3, 4 e 9. Sumariamente, foram

encontradas 12 vias metabólicas em todo o genoma. Destas 12 vias metabólicas, 4 demonstram uma percentagem de similaridade baixa (8%, 18%, 53% e 60%) e outras 4 com uma percentagem de similaridade elevada (78%, 80%, 85% e 91%), as restantes 4 regiões não apresentaram uma percentagem de similaridade com a base de dados (Tabela 18).

**Tabela 18** - Resultados da pesquisa no sítio antiSMASH: LAP - linear azol(in)e-containing peptides; NRPS - non-ribosomal peptide synthetase; Other - cluster containing a secondary metabolite-related protein that does not fit into any other category; RiPP-like - other unspecified ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide product (acedido a 6 de outubro de 2023).

<b>Contig</b>	<b>Região</b>	<b>Cluster mais semelhante conhecido</b>	<b>Tipo de produto</b>	<b>Similaridade</b>
1	4	Fengicina	NRP	53%
	5	Plantazolicina	RiPP:LAP	91%
	6	Schizokinen	Other	60%
2	1	Bacilisina	Other	85%
	2	Bacilibactina/ Bacilibactina E/ Bacilibactina F	NRP	80%
3	1	lichenysin	NRP	78%
4	1	Zwittermicin A	NRP+poly ketide	18%
9	1	surfactin	NRP:lipopeptide	8%

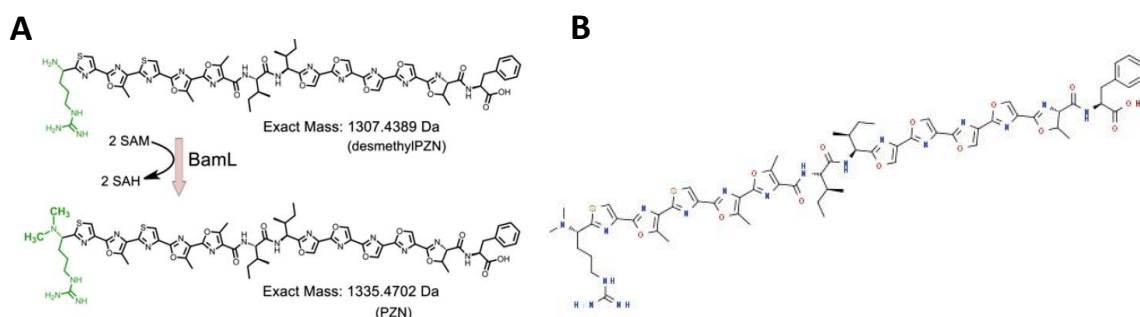
Foram identificados 4 clusters, assinaladas a verde na Tabela 18, com elevada percentagem de semelhança com clusters conhecidos. No cluster presente no *contig* 3 com 78% de similaridade, foram identificados 4 genes com core biossintético para a produção de metabolitos secundários caracterizados NRPS (péptidos de síntese não ribossómica) associados com funções de condensadores, AMP-binding, entre outros. Por sua vez, estes genes estão associados à produção de lichenysin em *Bacillus licheniformis* (Veith *et al.*, 2004).

Com 80% de similaridade verifica-se o cluster presente no *contig* 2, na região 2, associado à produção de bacilibactina, através de 3 gene de core biossintéticos *NRP-metallophore*: condensadores, AMP-binding, PP-binding, entre outros. Estes genes estão associados à produção de bacilibactina em *Bacillus sp.* (Wu *et al.*, 2020).

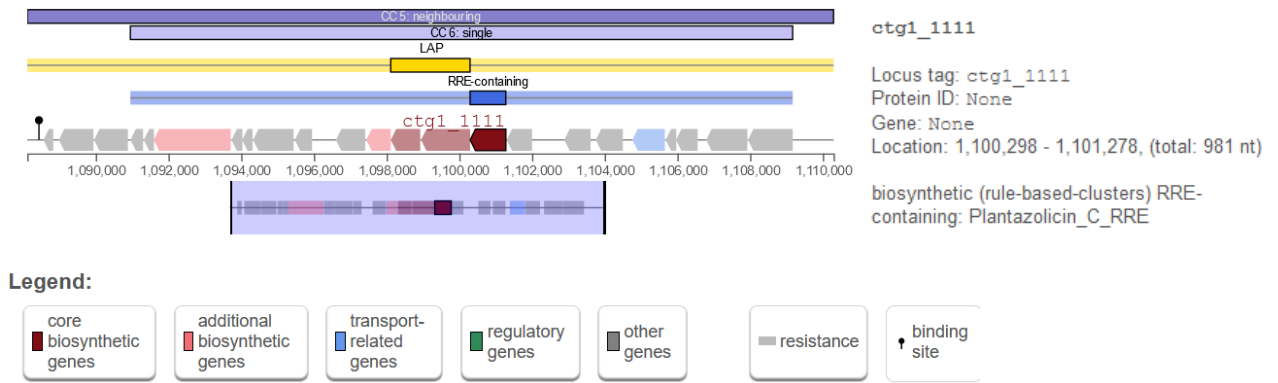
O cluster presente igualmente no *contig* 2 com 85% de similaridade, na região 1, está associado à produção de bacilisina, nos quais foram encontrados apenas 1 gene com core biossintético para a basilisina. Este gene pertence ao *cluster* de genes do *Bacillus velenzensis* FZB42 (Wu *et al.*, 2015). Em *Bacillus pumilus* 64-1 foi também encontrado 85% de similaridade com o mesmo composto, necessitando embora de mais estudos de modo a confirmar a origem da atividade antimicrobiana (Freitas-Silva *et al.*, 2021).

Por fim, o cluster presente no *contig* 1 na região 5 com 91% de similaridade. Esta região apresenta 23 genes: 3 genes com core biossintético, 2 genes de biossíntese adicional, 1 gene relacionado com transporte e 17 outros genes não identificados. De todos estes genes, apenas 11 identificaram-se com *score* de similaridade de 1,38 para um *cluster* produtor de plantazolicina pelo organismo *Bacillus pumilus* ATCC 7061, com *GenBank accession number* ABRX01000001.1 registado a 9 de julho de 2008 (antiSMASH, acedido a 6 de outubro de 2023) (Figura 24, Figura 26 e Figura 28) (Anexo III).

A plantazolicina foi identificada pela primeira vez por Scholz *et al.* em 2010 produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*. Com base na bibliografia, a plantazolicina é um péptido sintetizado por via ribossômica e que sofre modificações pós-tradução (RiPP, Classe I na classificação de bacteriocinas de *Bacillus*). Por sua vez, este composto enquadra-se na família de compostos TOMMs, ou seja, microcinas modificadas com tiazol/oxazol, estas que são inativas até às suas modificações que podem ser ciclodesidratações, desidrogenações entre outras (Burkhart *et al.*, 2015; Cox *et al.*, 2015; Li & Rebuffat, 2019 e Molohon *et al.*, 2011). Apenas em termos do N-terminal do precursor da plantazolicina, podem ocorrer dimetilação (Molohon *et al.*, 2011) ou formações azoline, modificações estas que comprometem a ativação destas moléculas e, por sua vez, a ação antimicrobiana da plantazolicina ativa (Dunbar *et al.*, 2015 e Molohon *et al.*, 2016). Apesar do modo de ação ainda não estar bem definido, este é associado a uma rápida e potente despolarização das membranas celulares, principalmente em *Bacillus anthracis* (Dunbar *et al.*, 2015 e Molohon *et al.*, 2016). Em termos de massa molecular, a massa média do péptido é por volta dos 1336,4780 Da, uma vez que, as diversas modificações que ocorrem sobre esta fazem variar esta massa, a título de exemplo, o processo de desmetilação verificado na Figura 23 (Dunbar *et al.*, 2015 e Lee *et al.*, 2013).



**Figura 23** – A – Modificação pós-tradução da plantazolicina, neste caso a desmetilação da arginina do N-terminal realçado a verde (in Lee *et al.* (2013)); B - Estrutura molecular da plantazolicina com fórmula molecular  $C_{63}H_{69}N_{17}O_{13}S_2$  e a massa molecular média de 1336,458 Da (retirado do ChemSpider, acedido a 15 de setembro de 2023).



**Figura 24** – Cluster de genes presente da região 5 do contig 1 com 91% de similaridade com o cluster produtor de plantazolicina pelo organismo *Bacillus pumilus* ATCC 7061. Em destaque o gene *ctg1\_1111* associado à produção de *pznC*. Os detalhes do gene encontram-se no canto superior direito (retirado de antiSMASH, acedido a 24 de outubro de 2023).

Dos 11 genes mencionados, um deles destacou-se, o gene *ctg1\_1111* com 981 nucleótidos de tamanho, com a denominação “*Plantazolicin\_C\_PRE*”, associado ao gene *BAT\_2469* do *cluster* mais semelhante mencionado. Com as sequências de nucleótidos e da sequência predita de aminoácidos do gene *ctg1\_1111*, executou-se *Blast* para os dois casos através dos programas *BlastN* e *BlastP* no portal *NCBI*.

O *Blast* de nucleótidos surtiu em 2 sequências de organismos diferentes, mas ambos com 100% de cover e com 100% de identidade. Estes organismos foram o *Bacillus pumilus* strain *B2-10* com *sequence ID* CP126081.1, 3892007 nucleótidos de comprimento, publicado a 27 de maio de 2023 e o *Bacillus pumilus* strain *MS32* com *sequence ID* CP092829.1, 3.824.664 nucleótidos de comprimento, publicado a 10 de abril de 2023. Para ambas as bactérias, até à data, ainda não foram publicados artigos científicos.

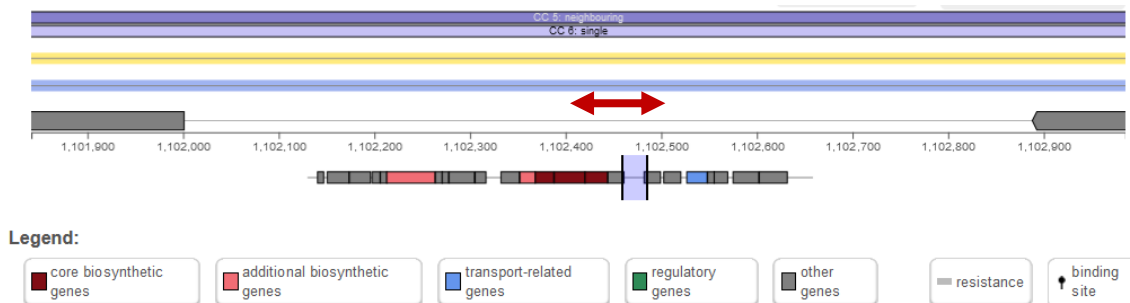
Para a sequência de aminoácidos, foi encontrada a sequência *ID* WP\_126741661.1 de 326aa de comprimento com 100% de identidade e 0% de *Gaps*. Esta está registada com o título “*TOMM precursor leader peptide-binding protein [Bacillus pumilus]*” e dentro desta encontra-se uma região localizada de 186 a 316 com comprimento de 131 aminoácidos mencionada como “*bacteriocin biosynthesis cyclodehydratase domain*”.



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
233 bits(126)	8e-63	126/126(100%)	0/126(0%)	Plus/Plus	
Query 1102421	ATGACTAAAATTACAATTC	CAACTGCTTTGTCTGCTA	AAGGTACATGGGGAAGGT	CAACAT	1102480
Sbjct 1	ATGACTAAAATTACAATTC	CAACTGCTTTGTCTGCTA	AAGGTACATGGGGAAGGT	CAACAT	60
Query 1102481	TTATTTGAACCAATGGCT	GCGCGCTGCACTTGCA	CAACAATCATCTCAAG	TTCTTCAACT	1102540
Sbjct 61	TTATTTGAACCAATGGCT	GCGCGCTGCACTTGCA	CAACAATCATCTCAAG	TTCTTCAACT	120
Query 1102541	TTCTAA	1102546			
Sbjct 121	TTCTAA	126			

**Figura 27** - Blast entre a seqüências de nucleótidos do contig 1 (Query) e a seqüência de nucleótidos do gene *pznA* do *Bacillus pumilus* ATCC 7061 (Sbjct) (retirado de NCBI, acessado a 29 de outubro de 2023).

Com base no resultado do *Blast* (Figura 27), confirmou-se, com 100% de identidade e 0% *Gaps*, a presença da seqüência de 126bp do gene *pznA* que sintetiza para o péptido precursor da plantazolicina. Esta seqüência foi localizada entre 1.102.421 e 1.102.546 nt na região 5 do *contig 1*, ou seja, integrado no *cluster* associado à produção de plantazolicina no isolado. A Figura 28 mostra mais detalhadamente a localização da seqüência encontrada. Esta localização coincide com a esperada do gene *pznA*, indicando que este não foi corretamente identificado.



**Figura 28** – Localização detalhada da seqüência com 100% de identidade com a seqüência do gene *pznA* do *B. pumilus* ATCC 7061 simbolizada com a seta vermelha (retirado de antiSMASH, acessado a 29 de outubro de 2023).

Sendo assim, o genoma do isolado S118E, mais propriamente do *Bacillus pumilus*, pode sintetizar plantazolicina como bacteriocina com atividade antimicrobiana. Isto porque apresenta a via metabólica completa para a síntese do péptido precursor da plantazolicina, bem como a síntese de enzimas com capacidade de modificar este péptido para a sua forma ativa, como é o caso da presença gene *pznC*.

## 4. CONCLUSÕES

Da Coleção de *Bacillus* da Universidade dos Açores, selecionaram-se 20 isolados do solo açoriano. Para o *screening* de atividade antimicrobiana dos isolados, testou-se por co-inoculação com três bactérias alvo: *M. luteus*, *S. aureus* e *E. coli*. Através dos seus resultados, foram escolhidos 7 isolados para a produção de AMP's em cultura líquida. Destes 7, verificou-se que 2 isolados apresentaram atividade apenas contra *M. luteus* em meio líquido LB. Para estes isolados, S117B e S118E, foram otimizadas as condições de cultura para a produção de AMP's.

Esta otimização consistiu em imobilizar as células produtoras resultantes de 50mL de cultura líquida em esferas de agar, para um volume final de 10mL. Este processo permitiu aumentar a densidade celular. As esferas foram recicladas até 6 vezes entre meios de cultura novos de 50mL por *batch*. Com este processo foi possível otimizar a produção de AMP's em ambos os isolados e, de entre os dois, o S118E registou mais atividade antimicrobiana. Verificou-se o pico de atividade no *batch* 3 deste isolado, com o aumento de 240% contra *M. luteus* e a recuperação de 220% contra *S. aureus*, relativamente ao sobrenadante inicial sem imobilização. Com o isolado S118E, imobilizou-se novamente as células, aumentando proporcionalmente a produção de sobrenadante com atividade antimicrobiana para 100mL de LB por *batch*. Para este aumento, verificou-se que o pico de atividade antimicrobiana foi igualmente registado no *batch* 3. Através do teste de difusão em placa de agar incubada com *S. aureus*, obteve-se 20mm de halo de inibição e para o mesmo teste com *M. luteus*, obteve-se 22mm de inibição. No teste de diluição em microplaca contra *S. aureus*, o *batch* 3 registou o valor mais elevado de 320 AU com fator de diluição  $\frac{1}{32}$ , enquanto o sobrenadante inicial sem imobilização com fator de diluição  $\frac{1}{2}$ , não registou atividade antimicrobiana.

Submeteu-se o composto ativo à ação da temperatura e à ação de enzimas proteolíticas. O composto demonstrou-se termolábil perdendo atividade depois de 6 horas a 37°C, 1h30 a 50°C, 1 h a 60 e 70°C, 20 minutos a 80°C e 5 minutos a 100°C. Também, o composto perdeu atividade antimicrobiana quando exposto a 5mg/mL de proteinase K por 1h de incubação a 50°C.

Dos processos de concentração e fracionamento dos sobrenadantes recolhidos dos *batch* 2, 3 e 4 da produção com 100mL de meio LB, o processo de precipitação otimizado com acetona foi o que demonstrou mais atividade, com 10240 AU. Com este produto, fracionou-se através da coluna *Superdex peptide*, das colunas de fase reversa C18 e RPC em FPLC. O composto com 320 AU de atividade foi eluído aos 24mL, indicando para moléculas com peso molecular menor que 5kDa. Na coluna compactada com resina C18, os compostos antimicrobianos foram eluídos com

4 frações diferentes de acetona. Sendo que os compostos com 640 AU e 5120 AU de atividade foram eluídos com 30% e 60% de acetona, respetivamente. Na coluna RPC em FPLC, verificou-se maior atividade antimicrobiana, 320 AU, quando a fração 60% C18 foi eluída, entre 14 e 26 minutos, com percentagens de acetona entre 55% e 100%. Obteve-se o *fold* de purificação mais elevado de 220,69, com 20% de recuperação para a amostra eluída com 60% da coluna de fase reversa C18, que apresentou ainda 0,29mg/mL de concentração proteica.

Os compostos produzidos pelo isolado S118E foram estudados por via proteómica e por via genómica. Em primeiro lugar, calculou-se as massas dos péptidos presentes nas amostras eluídas com 30% e 60% de acetona da coluna C18, através de MALDI-TOF MS. Em ambas, obtiveram-se tempos de retenção com aproximadamente 7 minutos e intensidade de  $1,1 \times 10^6$  cps. A amostra 30% C18 estava enriquecida em péptidos de 600 a 1000 Da e a amostra 60% C18 com 1000 a 1400 Da. Os 7 péptidos partilhados entre as duas amostras apresentavam entre 700 e 1024 Da, 4 péptidos menores que 1000 Da e 3 péptidos maiores que 1000Da. Em segundo lugar, identificou-se a espécie do isolado S118E através da sequenciação do gene 16S como *Bacillus pumilus*, confirmado pela sequenciação do genoma total. Este genoma com 3,6 Mbp, assemblado com o genoma de referência *B. pumilus* ASM302079v1, obteve uma cobertura de 99,86% e um mapeamento de 90,85%. Através da mineração genómica, encontrou-se 4 *clusters* com 78%, 80%, 85% e 91% de similaridade com *clusters* produtores de lichenisina, bacilibactina, bacilisina e plantazolicina, respetivamente. Destacou-se o *cluster* com 91% de similaridade, tendo sido identificado o gene *pznC*, *Plantazolicina\_C\_PRE*, que sintetiza para enzimas modificadoras no péptido precursor da plantazolicina sintetizado por via ribossomal. A plantazolicina é uma bacteriocina sintetizada por algumas bactérias, incluindo *Bacillus pumilus*. Através da comparação da sua via metabólica verificou-se que na sequência do isolado S118E não se identificou o gene precursor da plantazolicina. Contudo, através do *Blast* entre o genoma do isolado e da sequência do gene *pznA* confirmou-se, com 100% de identidade, a presença deste gene localizado interiormente ao *cluster* em causa.

Com esta dissertação foi possível identificar péptidos antimicrobianos produzidos por *Bacillus pumilus* isolado do solo Açoriano com atividade contra *S. aureus*. Com base na informação proteómica e genética obtida, somando a caracterização do composto, o isolado S118E sintetiza para compostos de pequena dimensão, hidrofóbicos, termolábeis, de natureza proteica e regulados por mecanismos de *quorum sensing*. Ainda, pode-se afirmar que, caso o composto seja sintetizado por via ribossomal, este encontra-se na classe I de bacteriocinas produzidas por *Bacillus*, pois apresenta péptidos com menos de 5kDa. Estes resultados vão de encontro às características apresentadas pela plantazolicina, considerando esta bacteriocina um

dos péptidos putativos produzidos pelo isolado S118E. Contudo, mostra-se necessário analisar mais detalhadamente os péptidos produzidos por este isolado. Esta análise irá permitir determinar qual o péptido responsável pela atividade antimicrobiana verificada contra *S. aureus*, determinar a sua sequência e identificar possíveis modificações estruturais. Assim, a purificação mais exaustiva da molécula ativa irá permitir concretizar os objetivos referidos anteriormente, bem como determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e o modo de ação contra *S. aureus*.

Futuramente, o estudo mais aprofundado destes compostos poderá revelar o potencial destes compostos como *leaders* na produção de novos fármacos, como por exemplo os anti-MRSA, de probióticos, de preservantes alimentares, entre outros.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkhalili, R. N., Bernfur, K., Dishisha, T., Mamo, G., Schelin, J., Canbäck, B., Emanuelsson, C. & Hatti-Kaul, R. (2016). Antimicrobial protein candidates from the Thermophilic *Geobacillus* sp. strain ZGt-1: production, proteomics, and bioinformatics analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1363.
- Ansari, A., Zohra, R. R., Tarar, O. M., Qader, S. A. U., & Aman, A. (2018). Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant Bacteriocin active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC microbiology*, 18(1), 1-10.
- antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures, and visualization. Kai Blin, Simon Shaw, Hannah E Augustijn, Zachary L Reitz, Friederike Biermann, Mohammad Alanjary, Artem Fetter, Barbara R Terlouw, William W. Metcalf, Eric JN Helfrich, Gilles P van Wezel, Marnix. H Medema & Tilmann Weber *Nucleic Acids Research* (2023) [doi: 10.1093/nar/gkad344](https://doi.org/10.1093/nar/gkad344).
- Aunpad, R., & Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current Microbiology*, 55, 308-313.
- Berić, T., Stanković, S., Draganić, V., Kojić, M., Lozo, J., & Fira, D. (2013). Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS 50.2 isolated from soil sample. *Journal of applied microbiology*, 116(3), 502-510.
- Burkhart, B. J., Hudson, G. A., Dunbar, K. L., & Mitchell, D. A. (2015). A prevalent peptide-binding domain guides ribosomal natural product biosynthesis. *Nature chemical biology*, 11(8), 564-570.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R. & Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 251-256. (Cladera-Olivera *et al.*, 2004)
- Cox, C. L., Doroghazi, J. R., & Mitchell, D. A. (2015). The genomic landscape of ribosomal peptides containing thiazole and oxazole heterocycles. *BMC genomics*, 16, 1-16.
- Dunbar, K. L., Tietz, J. I., Cox, C. L., Burkhart, B. J., & Mitchell, D. A. (2015). Identification of an auxiliary leader peptide-binding protein required for azoline formation in ribosomal natural products. *Journal of the American Chemical Society*, 137(24), 7672-7677.

- Freitas-Silva, J., de Oliveira, B. F. R., Vigoder, F. D. M., Muricy, G., Dobson, A. D., & Laport, M. S. (2021). Peeling the layers away: The genomic characterization of *Bacillus pumilus* 64-1, an isolate with antimicrobial activity from the marine sponge *Plakina cyanorosea* (Porifera, Homoscleromorpha). *Frontiers in Microbiology*, *11*, 592735. (Freitas-Silva et al., 2021)
- Haddaji, N., Chakroun, I., Fdhila, K., Smati, H., Bakhrouf, A., & Mzoughi, R. (2022). Pathogenic impacts of *Bacillus cereus* strains on *Crassostrea gigas*. *Foodborne Pathogens and Disease*, *19*(2), 151-158.
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. & Nesme, X. (2009). Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in applied microbiology*, *48*(2), 253-260.
- Jamuna, M., & Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 433-439.
- Karagiota, A., Tsitsopoulou, H., Tasakis, R. N., Zoumpourtikoudi, V., & Touraki, M. (2021). Characterization and quantitative determination of a diverse group of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 antibacterial peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*, 555-570.
- Kindoli, S., Lee, H. A., & Kim, J. H. (2012). Properties of Bac W42, a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* W42 isolated from Cheonggukjang. *Journal of microbiology and biotechnology*, *22*(8), 1092-1100.
- Kumar, P., & Aradhyam, G. K. (2014). Easy and efficient protocol for purification of recombinant peptides. *Protein Expression and Purification*, *95*, 129-135.
- Lee, J., Hao, Y., Blair, P. M., Melby, J. O., Agarwal, V., Burkhart, B. J., Nair, S. K. & Mitchell, D. A. (2013). Structural and functional insight into an unexpectedly selective N-methyltransferase involved in plantazolicin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(32), 12954-12959.
- Lei, S., Zhao, R., Sun, J., Ran, J., Ruan, X., & Zhu, Y. (2020). Partial purification and characterization of a broad-spectrum bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* zrx03 isolated from infant's feces. *Food science & nutrition*, *8*(5), 2214-2222.

- Li, Y., & Rebuffat, S. (2020). The manifold roles of microbial ribosomal peptide-based natural products in physiology and ecology. *Journal of Biological Chemistry*, 295(1), 34-54.
- Mercado, V., & Olmos, J. (2022). Bacteriocin Production by *Bacillus* Species: Isolation, Characterization, and Application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-19.
- Molohon, K. J., Blair, P. M., Park, S., Doroghazi, J. R., Maxson, T., Hershfield, J. R., Flatt, K. M., Schroeder N. E., Ha T. & Mitchell, D. A. (2016). Plantazolicin is an ultranarrow-spectrum antibiotic that targets the *Bacillus anthracis* membrane. *ACS infectious diseases*, 2(3), 207-220. (Molohon *et al.*, 2016)
- Molohon, K. J., Melby, J. O., Lee, J., Evans, B. S., Dunbar, K. L., Bumpus, S. B., Kelleher, N. L. & Mitchell, D. A. (2011). Structure determination and interception of biosynthetic intermediates for the plantazolicin class of highly discriminating antibiotics. *ACS chemical biology*, 6(12), 1307-1313.
- Mouloud, G., Daoud, H., Bassem, J., Laribi Atef, I. & Hani, B. (2013). New Bacteriocin from *Bacillus clausii* S trainGM17: Purification, Characterization, and Biological Activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171, 2186-2200.
- National Center for Biotechnology Information. (2023) National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - acedido a 29/10/2023.
- Scholz, R., Molohon, K. J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A. L., Süßmuth, R. D., Mitchell, D. A. & Borriss, R. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of bacteriology*, 193(1), 215-224.
- Sharma, N., Kapoor, R., Gautam, N., & Kumari, R. (2011). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* R75 isolated from fermented chunks of mung bean (*Phaseolus radiatus*). *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 169.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bedard, F., Biron, E., Drider, D. & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1), fuaa039.
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. In *Methods in enzymology* (Vol. 182, pp. 50-68). Academic Press.
- Terlouw, Blin, *et al.* *Nucl. Acids. Res.* gkac1049, doi: [10.1093/nar/gkac1049](https://doi.org/10.1093/nar/gkac1049) (acedido pela última vez a 29 de outubro de 2023).

- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST reading guide for broth microdilution, version 4.0, 2022.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Leisegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A. & Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Microbial Physiology*, 7(4), 204-211.
- Weber, T., and Kim, H.U. (2016). The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synth. Syst. Biotechnol.* 1:69-79, doi: 10.1016/j.synbio.2015.1012.1002. (Weber *et al.*, 2016)
- World Health Organization, 27 de fevereiro de 2017, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (acedido pela última vez a 29 de outubro de 2023).
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., & Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific reports*, 5(1), 12975.
- Wu, Q., Throckmorton, K., Maity, M., Chevrette, M. G., Braun, D. R., Rajski, S. R., Currie, C. R., Thomas, M. G. & Bugni, T. S. (2020). Bacillibactins E and F from a Marine Sponge-Associated *Bacillus* sp. *Journal of natural products*, 84(1), 136-141.
- Wu, X. Y., Walker, M. J., Hornitzky, M., & Chin, J. (2006). Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of microbiological methods*, 64(1), 107-119.
- Zhang, H., Huang, P. F., Meng, E., Li, W. Y., Zhou, L., Zhu, L. Y., Wu, L., Li, M. J., Liang, S. P. & Zhang, D. Y. (2015). An efficient strategy for heterologous expression and purification of active peptide hainantoxin-iv. *PLoS One*, 10(2), e0117099, doi:10.1371/journal.pone.0117099.
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., & Huang, G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International journal of biological macromolecules*, 117, 781-789.

## **ANEXOS**

## Anexo I

*Tabela 19 - Caracterização dos meios de cultura utilizados.*

Meio (1 Litro)	Composto	Marca	Quantidade (gramas)
Agar nutritivo	Agar bacteriológico (NO.1)	Oxoid	15
	Meio nutritivo	Bioka	20
Agar nutritivo mole	Agar bacteriológico (NO.1)	Oxoid	7,5
	Meio nutritivo	Biokar	20
LB	L.B. meio	Liofilchem	20
BHI	Infusão BHI	Oxoid	37
T3 agarizado	Agar bacteriológico tipo E	Biokar	15
	Peptona bacteriológica	Liofilchem	5
	Extrato de levedura	Biokar	1,5
	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck	0,002
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sigma	0,02
	NaHPO <sub>4</sub>	Merck	1,4
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Merck	1,38
Agar beads	Agar bacteriológico (NO.1)	Oxoid	35

## Anexo II

Sequência consensus do gene 16S do isolado S118E:

>S118e\_16s\_consensus\_Bacillus pumilus strain EBCH15 16S ribosomal RNA gene \_  
99.21identidade

```
AGCGCACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAG
GATGAAAGACGGTTTTCGGCTKTCACCTACAGATGGACCCSGGSSCATWAGYTAGTTGGTGSGGTAAWG
GCTCACCAAGGAGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTGC
CTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT
GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAG
GGTTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTC
AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGCAACAGCCGAAGTC
GGTGAGGTGAATCAC
```

### Anexo III

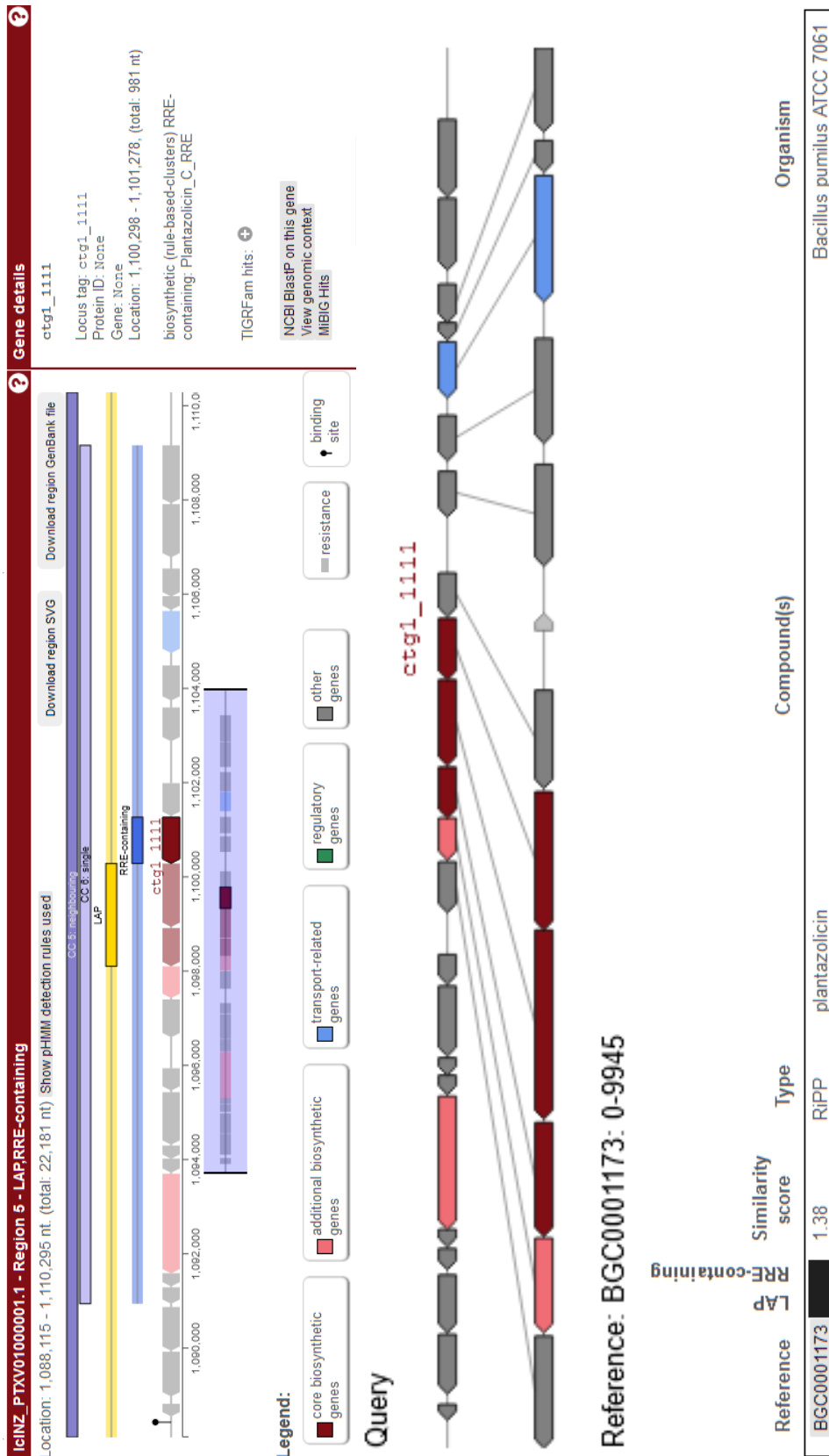


Figura 29 - Via metabólica para o cluster com 91% de similaridade, 1,38 score de similaridade para o cluster produtor de plantazolicina em *Bacillus pumilus* ATCC 7061 (Retirado de antiSMASH, acessado a 6 de outubro de 2023).

**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

Rua da Mãe de Deus  
9500-321 Ponta Delgada  
Açores, Portugal



2023

DM

# Pesquisa de AMP's em *Bacillus Açorianus* contra *Staphylococcus*

Sabrina da Silva Pacheco