



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUÍSA CARVALHO ANDRADE

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS MARINHOS ISOLADOS NA BAÍA DE
TODOS OS SANTOS COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A BACTÉRIAS
PATOGÊNICAS**

Salvador
2014

LUÍSA CARVALHO ANDRADE

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS MARINHOS ISOLADOS NA BAÍA DE
TODOS OS SANTOS COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A BACTÉRIAS
PATOGENICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Salvador
2014

A553 Andrade, Luísa Carvalho
Bioprospecção de microrganismos marinhos isolados na Baía de Todos os Santos com atividade antagonista a bactérias patogênicas / Luísa Carvalho Andrade. – Salvador, 2014
50 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque.
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Biotecnologia – Todos os Santos, Baía de (Ba) 2. Agentes antifécciosos. 3. Ecologia microbiana – Todos os Santos, Baía de (Ba) I. Roque, Milton Ricardo de Abreu. II. Almeida, Paulo Fernando de. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU – 579.26(813.8)

CDD-510.7
CDU-51(07)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua presença em minha vida, trazendo - me esperança, conforto e força.

À minha família, meu pai Gilberto, minha mãe Norma, minha irmã Júlia e minha avó Ruth. A melhor família que existe! Agradeço por fazer parte dela e pelo apoio e compreensão de sempre.

Ao meu namorado, Rafael, de quem eu me orgulho muito, pelo companheirismo, amor, carinho e motivação.

Às minhas queridas amigas do laboratório Bioprospector: Aldinéia, Brena, Carla, Carine, Diana, Fúlvia e Jamille. Todas foram tão importantes nesta trajetória, sempre me estimulando e ajudando, mas gostaria especialmente de agradecer a Carine e a Brena pelo imenso apoio na finalização deste trabalho, a Jamille por estar comigo desde o começo e Fúlvia pelos auxílios e palavras de conforto.

Aos meus amigos do laboratório Bioprospector: Edmundo, Hendor, Luiz e Marcos pelas dicas e incentivos. Especialmente a Hendor, sempre disposto a trabalhar nos fins de semana ao meu lado e a Edmundo por todo carinho e suporte.

Aos meus amigos do laboratório LABEM: Betânia, Cátia, Diego, Elderlei, Leila, Roberta, Rodrigo e Sueli por estarem presentes nos bons e nos maus momentos, me aconselhando a seguir em frente. Em especial à Roberta e Sueli, pela grande força, devomuito a elas!

Às minhas amigas do mestrado Aryane, Priscila e Isabela pelas horas de estudos nas disciplinas.

Ao meu orientador Professor Dr. Milton Roque pela oportunidade de crescimento, por todo aprendizado, pela amizade e pela compreensão.

Ao professor Dr. Paulo Almeida, meu co-orientador, pelo apoio e por me disponibilizar seu laboratório.

Ao LABEM por me receber tão bem em 2009, onde aprendi e cresci muito e fiz amizades para vida toda.

A FAPESB pelo apoio financeiro a este projeto.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Sem os percalços e problemas do cotidiano, que
devem ser superados, ninguém consegue
ultrapassar as barreiras dos próprios limites.

Psicografia de Divaldo Pereira Franco

Ditado pelo Espírito Marco Prisco

ANDRADE, Luísa Carvalho. Bioprospecção de microrganismos marinhos isolados na Baía de Todos os Santos com atividade antagonista a bactérias patogênicas. 50 f. il. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

A Baía de Todos os Santos (BTS), segunda maior baía do Brasil, abriga grande diversidade de ambiente, flora e fauna, porém pouco se sabe sobre sua diversidade microbiológica e seu potencial de bioprospecção. Este trabalho teve por objetivo a busca de novas substâncias antimicrobianas, capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicashumanas e de animais marinhos, isolados do solo de cinco praias da BTS. No total foram isoladas 107 bactérias das quais dez apresentaram produção de substâncias antimicrobianas. Após o sequenciamento verificou-se que dos dez isolados, somente oito foram de fato identificadas molecularmente, sendo sete destes membros da família Bacillaceae, grupo ao qual pertencem diversas produtoras de substâncias antimicrobianas. Entre os isolado que apresentaram produção de substâncias inibidoras do crescimento constatou-se que os isolados 21, 50 e 54 tinham maior poder de inibição. O extrato destes três isolados foi confeccionado através da acidificação do sobrenadante livre de células, isolado após o período de incubação. Os extratos do isolado 21 e do isolado 50 foram capazes de inibir a bactéria *Klebsiella rizophyla*, e o extrato 21 conseguiu ainda inibir a *Vibrio vulnificus*. Após verificação molecular através de primers específicos de sete substâncias antimicrobianas produzidas por *Bacillus*, constatou-se que os isolados 21 e 50 são produtores da substância ericina.

Palavras-chave: Bioprospecção, Antimicrobianos, Bacillus, Ecologia Microbiana

ANDRADE, Luísa Carvalho. Bioprospecting of marine microorganisms isolated in the Bay of All Saints with activity antagonist to bacteria pathogenic. 50 pp. il. 2014. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ABSTRACT

The All Saints's Bay (BTS), the second largest bay in Brazil, where can be founded great diversity of flora and fauna including diversity of landscapes, but unknown about their microbial diversity and potential to bioprospecting. This study aimed to search for new antimicrobial substances that can be able to inhibit the growth of human pathogenic bacterias and marine animals, isolated from sediment from five BTS beaches. Was isolated a total of 107 bacterias where 10 showed antimicrobial substances production. After 16S sequencing, was found that from the ten isolates, only eight were identified by amplification PCR and seuqencing, seven members of the Bacillaceae family, where antimicrobial substances belonging this group are known. It was found that the isolates numbers 21, 50 and 54 had a greater power of inhibition. The extract of these three strains was made by acidification of the cell-free supernatant, isolated after the incubation period. The extracts of the isolate 21 and 50 were able to inhibit the bacteria *Kocuria rhizophyla* , and the same extract could also inhibit *Vibrio vulnificus*. In advance, was realized a molecular bioprospecting using specific molecular primers from conserved regions belongs to seven antimicrobial substances produced by Bacillus. It was found that the isolates 21 and 50 are Erycina producing.

Keywords:Bioprospecting, Antimicrobials, Bacillus, BTS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Mapa da Baía de Todos os Santos com a indicação em azul dos locais de coleta. 24
- Figura 2.** Imagens das praias São Francisco do Conde (1), Saubara (2), Maragogipe (3), Salinas das Margaridas (4) e Vera Cruz (5), Bahia, 2013. 37
- Figura 3.** Imagens dos tubos de coleta com amostras de cada praia: São Francisco do Conde – SFC (1), Saubara (2), Vera Cruz (3), Salinas das Margaridas (4), Maragogipe (5). 38
- Figura 4.** Seleção das colônias nas placas originais com indicação de inibição. Colônias 38, 42, 47, 58, 101 e 105. 41
- Figura 5.** Imagens das colônias selecionadas por sua coloração ou morfologia diferenciada. 45
- Figura 6.** Halos de inibição dos dez isolados contra a bactéria *V. vulnificus*. 50
- Figura 7.** Imagens da inibição realizada pelo extrato do isolado 21 sobre as bactérias patogênicas *V. vulnificus* e *K. rizophyla*, respectivamente. 54
- Figura 8.** Eletroforese dos produtos amplificados referentes aos *primers* de Ericina A (*eriA*), Subtilosina (*Sob*) e Mersacidina (*MrsA*), pelos isolados 21, 29, 38, 50 e 54. 59

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> de bacteriocinas utilizados na análise por PCR. | 33 |
| Tabela 2. Localização dos pontos de coleta nas cinco praias, Bahia, 2013..... | 35 |
| Tabela 3. Tabela indicando os resultados da coloração de Gram de dez isolados... | 46 |
| Tabela 4. Tabela indicando os resultados dos melhores isolados inibidores. | 50 |
| Tabela 5. Produção de precipitado por isolado em 500 MI de meio Caldo Nutriente. | 53 |
| Tabela 6. Resultado do sequenciamento das bactérias isoladas neste trabalho. | 56 |
| Tabela 7. Amplificação das regiões referentes a bacteriocinas por bactérias com atividade antibacteriana. | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| B.O.D. | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| BTS | Baía de Todos os Santos |
| CCMICS | Coleção de Culturas de Microrganismos do Instituto de Ciências da Saúde |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> Entero-Hemorrágica |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> Entero-Patogênica |
| LABEM | Laboratório de Bioprospecção e Ecologia de Microrganismos |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| TDH | Hemolisinas Termoestáveis Diretas |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 3.1. BAÍA DE TODOS OS SANTOS | 17 |
| 3.2. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS MARINHOS PRODUTORES DE METABÓLITOS BIOATIVOS | 18 |
| 3.3. ANTIMICROBIANOS | 19 |
| 3.4. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS | 19 |
| 3.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| 3.4.2. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 20 |
| 3.4.3. <i>Enterococcus faecalis</i> | 20 |
| 3.4.4. <i>Kocuria rhizophyla</i> | 21 |
| 3.4.5. <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 3.4.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 22 |
| 3.4.7. <i>Enterobacter aerogenes</i> | 22 |
| 3.4.8. <i>Salmonella typhimurium</i> | 22 |
| 3.4.9. <i>Vibrio vulnificus</i> | 22 |
| 3.4.10. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 23 |
| 3.4.11. <i>Vibrio mimicus</i> | 23 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA E COLETA DAS AMOSTRAS .. | 24 |
| 4.1.1. LOCALIZAÇÃO | 24 |
| 4.1.2. COLETA DAS AMOSTRAS | 25 |
| 4.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS | 25 |
| 4.2.1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS | 25 |
| 4.2.1.1. Meio Marinho Zobell | 25 |
| 4.2.1.2. Meio Caldo e Ágar Nutriente | 26 |
| 4.2.1.3. Meio Ágar Muller-Hinton | 26 |
| 4.2.2. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS | 26 |
| 4.2.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3. TRIAGEM DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ANTIMICROBIANOS | 27 |
| 4.4. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM O SOBRENADANTE..... | 28 |
| 4.5. EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS | 29 |
| 4.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM OS EXTRATOS | 29 |
| 4.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS..... | 30 |
| 4.7.1. Extração de DNA | 30 |
| 4.7.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 31 |
| 4.7.3. Purificação dos produtos de PCR..... | 31 |
| 4.7.4. Sequenciamento das amostras..... | 32 |
| 4.8. TRIAGEM DE BACTERIOCINAS POR ANÁLISE MOLECULAR..... | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 5.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA E COLETA DAS AMOSTRAS .. | 35 |
| 5.1.1. LOCALIZAÇÃO | 35 |
| 5.1.2. COLETA DAS AMOSTRAS..... | 37 |
| 5.2. MEIOS DE CULTURA E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS..... | 38 |
| 5.2.1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS | 38 |
| 5.2.2. ISOLAMENTOS DAS BACTÉRIAS..... | 39 |
| 5.2.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA | 45 |
| 5.3. TRIAGEM DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ANTIMICROBIANOS | 47 |
| 5.4. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM O SOBRENADANTE..... | 51 |
| 5.5. EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS | 52 |
| 5.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COMO EXTRATOS | 53 |
| 5.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS..... | 55 |
| 5.8. TRIAGEM DE BACTERIOCINAS POR ANÁLISE MOLECULAR..... | 57 |
| 6. CONCLUSÃO | 60 |
| REFERÊNCIAS..... | 60 |

1. INTRODUÇÃO

O uso de antimicrobianos para controle de doenças patogênicas humanas é indispensável ao sistema de saúde mundial, devido a sua eficácia e ao fácil acesso. Porém, a utilização errada permitiu que uma gama de bactérias tornasse resistente a antimicrobianos comumente utilizados na clínica (PHELAN, 2013).

A dependência do uso de antibióticos tem preocupado o meio científico como um todo, tornando-se alvo de discussões e pesquisas devido à dificuldade de desenvolver novas terapias para cura de enfermidades causadas por alguns patógenos microbianos resistentes (PIETRO, 2012).

Não somente bactérias patogênicas humanas estão sendo afetadas pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. Resíduos destes medicamentos ocasionalmente são expostos no meio ambiente. Em contato com estas substâncias, bactérias ambientais podem adquirir resistência e, eventualmente, burlar o sistema de defesa de animais marinhos e corais, desenvolvendo assim infecções graves que podem ser incontroláveis (EBRAHIMPOUR, 2011).

Uma solução possível para esta problemática seria a bioprospecção de novas substâncias bioativas produzidas por bactérias encontradas em locais pouco explorados microbiologicamente, como o ambiente marinho. É fato que a microbiota marinha abrange um número muito maior de espécies do que as catalogadas pela comunidade científica até então. Em face destas observações, especula-se que a quantidade de material biológico a ser obtida destas bactérias para fins medicinais seja elevada e promissora (VALAN, 2012).

Em se tratando de ecossistema, a Baía de Todos os Santos (BTS) é um local com grande potencial biológico. Por se tratar da segunda maior baía do Brasil e abrigar a maior cadeia de corais da América do Sul, possui alta biodiversidade de ambientes, animais, corais e plantas, porém, pouco se sabe ainda sobre a comunidade microbiológica (HATJE; ANDRADE, 2009; CELINO, 2006).

Suas principais atividades econômicas são o pescado, mariscagem e a exploração do petróleo. Qualquer distúrbio no ecossistema da BTS poderá favorecer a proliferação de bactérias patogênicas de animais, moluscos e corais, a exemplo das integrantes da família Vibrionaceae. Uma contaminação deste tipo geraria grandes perdas econômicas às comunidades ribeirinhas, que necessitam de um

ecossistema equilibrado para sobreviver (HATJE; ANDRADE, 2009). Essa situação é visualizada nas “marés vermelhas” onde ocorre a proliferação de microalgas capazes de produzir substâncias tóxicas causando assim a mortandade de peixes (SCHMITT & PROENÇA, 1999).

Por todo o exposto, a exploração e o estudo da microbiota do solo da BTS tem como objetivos o conhecimento da comunidade microbiana da região e a busca de novas substâncias antimicrobianas capazes de inibir bactérias patogênicas, tanto humanas quanto de animais marinhos e corais. Tal abordagem revela-se importante para o desenvolvimento e a ampliação da gama de antimicrobianos a serem utilizados no controle de doenças infecciosas.

2.OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Isolamento de bactérias marinhas presentes no solo de cinco praias da Baía de Todos os Santos (BTS) – Maragogipe, Salinas das Margaridas, São Francisco do Conde, Vera Cruz e Saubara – e avaliar o potencial destas bactérias em relação à produção de metabólitos com atividade antagonista a bactérias de interesse clínico.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar o local de coleta das amostras na Baía de Todos os Santos.
- Realizar o isolamento de bactérias presentes no local de estudo selecionado.
- Triar, dentre as bactérias isoladas, microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas.
- Testar o extrato das bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas, obtidas no teste de triagem, contra cepas padrão de bactérias patogênicas.
- Identificar, através de sequenciamento molecular, as bactérias que apresentaram resultados positivos no ensaio da atividade antimicrobiana.
- Realizar a triagem de bacteriocinas por análise molecular.

3.REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. BAÍA DE TODOS OS SANTOS

Localizada na porção meridional costeira do estado da Bahia, a Baía de Todos os Santos (BTS) situa-se entre a latitude 12°50' sul e a longitude 38°38' oeste. É a segunda maior baía do Brasil em extensão e a maior navegável, com 1233km² de área total e 462km de faixa costeira. Apesar da sua grande extensão, esta baía é considerada rasa por ter profundidades variando de 6 a 70 metros (HATJE; ANDRADE, 2009). Dos dez portos e terminais marítimos existentes no Estado da Bahia, a BTS abriga oito, evidenciando assim sua importância socioeconômica para o estado (HATJE; ANDRADE, 2009; CELINO, 2006).

A BTS possui uma grande diversidade de ecossistemas, estuários, recifes de corais, planícies de maré e manguezais. Com diferentes características químicas e físicas, podem comportar distintos organismos e habitats específicos (BARROS et al., 2012). Considerada baía de maré, a sua extensão possui um vasto manguezal, ecossistema que abriga diversas espécies marinhas. O manguezal é também um importante transformador na ciclagem de nutrientes e material orgânico (CELINO, 2006; SOUTO, 2009; JESUS, 2011).

Circundada pela região metropolitana de Salvador, capital baiana, a BTS possui atualmente mais de três milhões de habitantes distribuídos em toda sua extensão e oferece para muitos destes habitantes o sustento diário através da pesca e da mariscagem. De acordo com Hatje e Andrade (2009), o desenvolvimento do estado da Bahia está intimamente relacionado com a interação homem e meio ambiente. Pelas suas riquezas e diversidade de ecossistemas, a BTS tem potencial para diversas pesquisas dos seus recursos em diversos segmentos. Contribuindo assim, substancialmente, com benefícios não só para a comunidade local, bem como para todo o estado.

3.2. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS MARINHOS PRODUTORES DE METABÓLITOS BIOATIVOS

Devido ao aumento de bactérias resistentes a antibióticos, surgiu uma demanda de novos antimicrobianos para serem utilizados na medicina, clínica veterinária e em alimentos. Alguns metabólitos bacterianos possuem atividades antibacterianas, antivirais e até antifúngicas. Até então, a maioria dessas bactérias capazes de produzir essas substâncias foram isoladas de sedimentos continentais (PIETRO, 2012).

O ambiente marinho é o maior reservatório químico e biológico de diversidades devido a sua grandeza. Possui potencial de exploração de novos microrganismos e conseqüentemente de novos metabólitos bioativos. Estudos envolvendo este ambiente adquiriram importância nos últimos anos. Dessa forma, tem-se buscado como fontes de metabólitos bioativos, regiões costeiras ao longo de todo o globo (VALAN, 2012).

No meio marinho, poucas bactérias permanecem na coluna d'água, a maioria conserva-se aderida a partículas na parte superficial do sedimento marinho, em razão desta camada possuir grandes quantidades de nutrientes orgânicos (KOLM, 2007). A produção das substâncias antimicrobianas acontece em conseqüência da interação de microrganismos diretamente uns com os outros, pois, desta forma, produzem mecanismos de defesa devido à competição por espaço e nutriente (PIETRO, 2012).

Os antimicrobianos produzidos por bactérias desempenham função fundamental no antagonismo bacteriano no ecossistema marinho devido à natureza hostil do ambiente. Qualquer vantagem que garanta a predominância de uma estirpe bacteriana sobre outra, ou sobre sua mesma espécie, é indispensável (EBRAHIMIPOUR, 2011).

A maioria dos antimicrobianos usados na clínica é derivada de produtos naturais de origem microbiana. Apesar de tradicionalmente estes microrganismos serem isolados de solo continental, o número de metabólitos bioativos isolados de organismos marinhos tem crescido de forma acelerada nos últimos anos (PHELAN, 2013).

3.3. ANTIMICROBIANOS

Os componentes antimicrobianos produzidos por bactérias podem ser amplamente divididos em dois grupos: a) metabólitos secundários não ribossomais; b) e proteínas e peptídeos sintetizados no ribossomo, grupo ao qual pertencem as bacteriocinas (PIETRO,2012). Segundo Aunpad (2007), bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados no ribossomo bacteriano ativo somente quando a bactéria produtora entra em contato com outra. Produção de bacteriocinas é um atributo comum entre varia bactérias Gram positivas.

Existem outros tipos de antimicrobianos produzidos por bactérias, mas as bacteriocinas são mais comuns e abundantes. Estas são divididas em quatro classes: I) lantibióticos; II) peptídeos não modificados; III) grandes proteínas; e IV) peptídeos cíclicos.

A classe I das bacteriocinas, os lantibióticos, consistem em pequenos peptídeos compostos de um grupamento de aminoácidos lantionina e uma série de aminoácidos desidratados. A classe II também é formada por pequenos peptídeos, estáveis quando aquecidos, porém não possuem aminoácidos lantionina. A classe III é composta por grandes peptídeos não resistentes ao calor. Ena classe IV são consideradas as bacteriocinas complexas, classe sobre a qual menos se conhece(MCAULIIE, 2000).Os lantibióticos são produzidos unicamente por bactérias Grampositivas e agem principalmente sobre bactérias também Gram positivas.

3.4. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Neste estudo, para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados, foram selecionadas onze bactérias patogênicas humanas.

3.4.1. *Staphylococcus aureus*

Microrganismo frequentemente encontrado no corpo humano, considerado como parte da microbiota normal da pele e fossas nasais. Também visto como uma das principais bactérias patogênicas responsável por amplas infecções, desde as localizadas até as generalizadas. Os principais fatores de virulência são componentes da superfície celular e toxinas, embora também produzam enzimas consideradas como fatores de virulência (TRABULSI et al., 2005).

Staphylococcus aureus é responsável principalmente por infecções nosocomiais, resultando em significativa morbidade e mortalidade em ambiente hospitalar (WALKER, 2013). Esta bactéria consegue manter-se resistente a uma gama de antibióticos devido a sua variabilidade genética, bem como fatores de virulência (SOMERVILLE, 2009). Amostras resistentes à meticilina são também consideradas resistentes aos demais β -lactâmicos (TRABULSI et al., 2005). *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina é endêmica em hospitais no mundo inteiro, configurando a principal causa de morbidade e mortalidade nestes ambientes (DELEO, 2010).

3.4.2. *Staphylococcus saprophyticus*

A *Staphylococcus saprophyticus*, bactéria Grampositiva coagulase negativa, é uma das principais bactérias uropatogênicas. Sua patogenicidade está associada à capacidade de aderir às células do epitélio urinário (BUERIS et al., 2005).

A uropatogenicidade de *S. saprophyticus* pode ser atribuída ao seu genoma. Para sua sobrevivência no trato urinário humano são providenciadas algumas adaptações como a produção de proteínas que se aderem a células do sistema urinário (KURODA, 2005).

3.4.3. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é a espécie mais frequente do gênero *Enterococcus*, que faz parte da microbiota normal do trato gastro-intestinal, podendo ser também encontrada na mucosa oral, vaginal e na pele. É isolada frequentemente em água contaminada, alimentos, no solo e em ambiente hospitalar. O seu fator de virulência está associado à citolisina (exoproteína com atividade lítica sobre eritrócitos e outras células humanas) e substância agregativa. Esta é uma proteína da superfície celular, que promove agregação das células da bactéria *E. faecalis* durante o processo de fixação na célula hospedeira (TEIXEIRA, 2005).

Conhecido como patógeno oportunista, a *E. faecalis* é responsável por infecções nosocomiais, do trato urinário, pós-operatório (incisão cirúrgica) e endocardite (em torno de 5% a 20%), que sem tratamento com antibióticos eficazes pode levar o indivíduo a morte. Por adquirir resistência a múltiplos antibióticos, a *E. faecalis* passou a ser um desafio clínico para o tratamento da endocardite,

destacando-se a necessidade de buscar novas alternativas e estratégias para produção de novos antibióticos (NALLAPAREDDY, 2006).

3.4.4. *Kocuria rhizophyla*

Kocuria rhizophyla é uma bactéria Gram positiva cocóide, pertence à família Micrococcaceae, da ordem Actinomycetales. Este gênero veio a partir do gênero *Micrococcus*. Bactérias do gênero *Kocuria* foram isoladas de várias fontes naturais, incluindo pele de mamíferos, solo, rizosfera, alimentos fermentados, amostras clínicas, água doce e sedimentos marinhos (BECKER, 2008; TAKARADA et al., 2008).

Existem poucos relatos deste gênero associados com infecções humanas. Moissenet (2012), em um estudo de caso, relata uma infecção da corrente sanguínea associada a cateter venoso central contaminado. Neste estudo, a cepa foi identificada por sequenciamento do gene rRNA como *K.rhizophyla*. Outro estudo realizado por Becker e colaboradores (2008) relata o caso de um paciente portador de acidemia metilmalônica, causada por sucessivas infecções por *K.rhizophyla*.

K. rhizophyla tem aplicações industriais, como exemplo, é comumente usada como cepa padrão de controle de qualidade para testes de susceptibilidade antimicrobiana (TAKARADA et al., 2008).

3.4.5. *Escherichia coli*

Bactéria Gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, do gênero *Escherichia*. A *E. coli* é a bactéria mais associada a infecções humanas, podendo acometer praticamente todos os tecidos orgânicos, portanto, é a mais isolada em laboratórios clínicos. A sorotipagem de *E. coli* baseia-se nos antígenos de superfície O (somático), H (flagelar), K (capsular) (KONEMAN, 2008).

Escherichia coli entero-patogênica (EPEC) é a primeira categoria diarreio-gênica. Existem duas subcategorias: EPEC típica e EPEC atípica. A característica comum às duas categorias é a não produção de toxina shigae ambas são capazes de causar lesão no epitélio do intestino (TRABULSI, 2005).

3.4.6. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, espécie de bactéria Gram negativa, pertence ao gênero *Klebsiella*, da família Enterobacteriaceae. A *K. pneumoniae* é o isolado clínico mais frequente associado à infecção pulmonar, podendo causar também outras infecções, como enterites, meningite, infecção do trato urinário e até mesmo septicemia (KONEMAM, 2008).

3.4.7. *Enterobacter aerogenes*

A espécie bacteriana *Enterobacter aerogenes* pertence ao gênero *Enterobacter*, da família Enterobacteriaceae. Estas bactérias são bacilos Gram negativos e estão amplamente distribuídos na água, nos esgotos, no solo e em vegetais. Fazem parte da microbiota entérica comensal, mas estão associadas a infecções oportunistas que acometem o trato urinário, as vias respiratórias, lesões cutâneas e podem até causar sepse e meningite (KONEMAN, 2008).

3.4.8. *Salmonella typhimurium*

Salmonella Typhimurium (*S. typhimurium*) é uma bactéria Gramnegativa que causa gastroenterite em seres humanos e animais. A salmonelose constitui uma das mais importantes causas das doenças entéricas bacterianas. As infecções humanas são comumente causadas por ingestão de alimentos contaminados por fezes humanas e de animais (KONEMAM, 2008; STEFANOVA, 2007).

As infecções por *Salmonella* são autolimitadas e a administração de antibióticos nos tratamentos de gastroenterites nem sempre favorece a recuperação clínica. No entanto, antibióticos são recomendados para salmonelose com complicações sistêmicas, e no caso da febre tifoide, na fase aguda da doença (CAMPOS, 2005).

3.4.9. *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus consiste em bacilo Gram negativo, halófilo, naturalmente encontrado em ambiente marinho. Considerado como um patógeno oportunista está associado às principais causas de infecções relacionadas com ingestão de frutos do mar (DANIELS, 2011).

O meio marinho é o habitat natural deste microrganismo. O monitoramento da presença de *Vibrio vulnificus* em águas do mar e em mariscos é de extrema relevância médica e econômica, já que este é patógeno de animais marinhos. O *V. vulnificus* é responsável por 95% das mortes relacionadas com frutos do mar nos EUA (WILLIAMS, 2013).

O tratamento para infecções causadas por *V. vulnificus* é realizado com antibióticos de largo espectro e são consideradas eficazes, havendo poucos relatos de resistência com este microrganismo. No entanto, este bacilo multiplica-se rapidamente, e o tratamento sempre está associado com outras drogas, já que na maioria dos relatos, os pacientes têm outras doenças bases (MATSUOKAA, 2013).

3.4.10. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria Gram negativa, halofílica, de origem marinha, filogeneticamente próxima ao *Vibrio cholerae* (MAKINO, 2003). Este agente patogênico entérico é responsável por gastroenterite aguda em humanos, geralmente associada ao consumo de frutos do mar crus ou mal cozida (BEJ, 1999).

Cepas de *V. parahaemolyticus* resistentes a antibióticos passou a ser uma séria ameaça para as indústrias de frutos do mar. A higienização adequada é extremamente importante para evitar contaminação cruzada de produtos alimentares (ELEXSON, 2014).

3.4.11. *Vibrio mimicus*

Vibrio mimicus é uma bactéria Gram negativa encontrada em ambientes de ecossistema aquático e de vida livre. Relatada como patógeno no cultivo de camarão podem causar gastroenterite em humanos. Os fatores de virulência produzidos por *Vibrio mimicus* são hemolisinas, fosfolipase, protease e enterotoxinas (LEE, 2002; PENG SUK, 2010).

Em animais aquáticos, causa ascite severa. O uso de antibiótico é a forma mais eficiente para o controle desta doença, no entanto, cepas cada vez mais resistentes têm surgido devido ao uso de diversas drogas, causando grande prejuízo econômico na aquicultura (CEN, 2013).

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA E COLETA DAS AMOSTRAS

4.1.1. LOCALIZAÇÃO

Os pontos eleitos para coletade solo encontram-se localizados na BTS, situada na porção central costeira do estado da Bahia em: latitude 12°50' sul e longitude 38°38' oeste. Os municípios onde foram realizadas as coletas foram escolhidos por serem localidades pouco habitadas, mas que caracterizam a BTS, sendo eles: São Francisco do Conde, Saubara, Maragogipe e Salinas das Margaridas. O município de Vera Cruz foi escolhido como controle externo da BTS. A localização geográfica destes pontos encontra-se na Figura 01.



Figura 1. Mapa da Baía de Todos os Santos com a indicação em azul dos locais de coleta.

4.1.2. COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas de sedimentos foram realizadas no decorrer dos anos de 2012 e 2013. A metodologia adotada para esta pesquisa objetivou coletar amostras da superfície do solo praiano, por esta faixa englobar a maioria da microbiota existente neste local. As amostras de sedimento foram coletadas com a introdução de um tubo tipo Falcon, estéril, de maneira perpendicular ao solo, extraindo assim 10cm da camada superficial deste (MOUSTAFA, 2006). Foram realizadas três coletas de sedimentos por praia, sendo os pontos estabelecidos de forma visual, distantes igualmente mediante a extensão da praia. A localização das amostras foi devidamente registrada por GPS, com o objetivo de possível reprodutibilidade das amostras.

Após coleta, as amostras foram rapidamente acondicionadas a 20°C para manutenção da integridade da microbiota local, transportadas em isopores com gelo e transferidas para o Bioprospector – Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprospecção, localizado no Instituto de Ciências da Saúde, da UFBA.

4.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

4.2.1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS

Os meios utilizados para crescimento bacteriano, produção dos metabólitos antagonistas e ensaio da atividade antimicrobiana foram, respectivamente, os meios Marinho Zobell, Caldo e Agar Nutriente e Ágar Muller-Hinton.

4.2.1.1. Meio Marinho Zobell

O meio Marinho Zobell foi adotado para o crescimento microbiano das amostras coletadas. Por ser um meio semelhante à composição da água do mar, favorece o crescimento de microrganismos marinhos. A sua composição consiste em (g/L): digerido péptico de tecido animal (5,00g); extrato de levedura (1,00g); citrato férrico (0,10g); cloreto de sódio (19,45g); cloreto de magnésio (8,80g); sulfato de sódio (3,24g); cloreto de cálcio (1,80g); cloreto de potássio (0,55g); bicarbonato de sódio (0,16g); brometo de potássio (0,08g); cloreto de estrôncio (0,034g); ácido bórico (0,022g); silicato de sódio (0,004g); fluorato de sódio (0,0024g); nitrato de amônia (0,0016g); fosfato dissódico (0,008g). O pH foi ajustado para $7,6 \pm 0,2$

(25°C). Para a utilização deste meio em fase sólida, adicionou-se 15 gramas de ágaragar, da marca Himedia, formando o meio Ágar Marinho Zobell.

4.2.1.2. Meio Caldo e Ágar Nutriente

Utilizou-se o meio Caldo e Ágar Nutriente comercial (Himedia e Acumedia, respectivamente) para o crescimento das bactérias e produção da síntese metabólica das possíveis substâncias antimicrobianas, por este ser considerado um meio genérico de crescimento. Sua composição consiste em (g/L): digestão péptica de tecido animal (5,00g); extrato de levedura (1,50g); extrato de carne bovina (1,50g); cloreto de sódio (5,00g). O pH final foi ajustado para $7,4 \pm 0,2$ em temperatura ambiente (25° C).

4.2.1.3. Meio Ágar Muller-Hinton

Este meio foi adotado para a realização do teste de atividade antimicrobiana, uma vez que é adotado como padrão pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI) para esta finalidade. Sua composição consiste em (g/L): extrato de carne (2,00g); hidrolisado ácido de caseína (17,50g); amido (1,50g); ágar (17,00g). O pH foi ajustado para $7,3 \pm 0,2$ em temperatura ambiente (25° C).

4.2.2. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

A metodologia adotada para o isolamento dos microrganismos foi adaptada da utilizada por Kolm (2007). As amostras que estavam nos tubos Falcons foram transferidas individualmente para placas de Petri estéreis e homogeneizadas para a realização da pesagem. Pesou-se em uma balança de precisão 15cm^3 de cada sedimento que em seguida foram introduzidos em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade total de 300 mL contendo 135 mL de meio Marinho Zobell. Posteriormente acondicionados em Agitador Kline (Cientec CT-150) a 80rpm durante 10 minutos e mantido em repouso por mais 10.

Objetivando isolar o maior número de microrganismos existentes nas amostras, realizou-se diluição seriada utilizando solução salina a 0,9% até a proporção 10^{-3} . Por fim, foram retirados 100 μL de cada diluição e colocadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio Ágar Marinho Zobell para a semeadura utilizando alças de Drigaslky para o espalhamento do inóculo. As placas foram

incubadas em estufa bacteriológicas em temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas com monitoramento diário. Este procedimento foi realizado em duplicata.

4.2.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Ao final do período de incubação, as colônias bacterianas foram avaliadas visualmente de acordo com suas características morfológicas, tendo sido selecionadas para isolamento primeiramente aquelas colônias com indício de provável inibição (Figura 04) ou coloração e morfologia diferenciadas.

O isolamento foi realizado através de estrias compostas em placas contendo 20 mL de meio Ágar Marinho Zobell, com comprovação do isolamento através de coloração de Gram, seguindo protocolo do laboratório, que consiste nas seguintes etapas: esfregaço da cultura em lâminas; fixação da amostra no fogo; banho em cristal violeta por um minuto; banho em lugol por um minuto; lavagem da lâmina com solução descolorante e água por 45 segundos e banho em fucsina por mais 45.

Os isolados foram conservados em tubos criogênicos contendo meio Caldo Nutriente e glicerol (proporção de respectivamente 85% e 15%). Cada colônia recebeu um número de registro único, e foram mantidas na CCMICS.

4.3. TRIAGEM DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ANTIMICROBIANOS

A triagem dos isolados seguiu o protocolo descrito por Darabpour (2010). As 107 colônias puras das bactérias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Marinho Zobell modificado. Os tubos foram incubados em uma incubadora tipo shaker (TE-420 TecNal) a 150 rpm e 28°C por três dias a fim de favorecer a produção de metabólitos secundários. A cepa padrão da bactéria *Vibriovulnificus* (ATCC 27562) foi utilizada em caldo como organismo teste devido ao fato de ser um conhecido patógeno de humanos, animais marinhos e corais.

Após o período de incubação, preparou-se 18 placas, contendo 20 mL de meio Ágar Muller-Hinton (Himedia) cada. Nestas placas foram inoculados 100 μL do cultivo da bactéria *Vibriovulnificus* (ATCC 27562). O inóculo foi previamente ajustado para a concentração de 10^8 ufc/mL usando como referência a escala de McFarland.

Em seguida, seis discos de papel com 6 mm de diâmetro foram dispostos de forma equidistante em todas as placas, e 10 μL de cada uma das 107 bactérias isoladas foi inoculado nos discos, sem filtração prévia. Aguardou-se 15 minutos antes de virar as placas e incubá-las na estufa B.O.D. (Demanda Bioquímica de

Oxigênio) por 18-24 horas. Os resultados foram analisados pela presença de halo de inibição ao redor do disco e devidamente registrados através de fotografias.

Com o objetivo de minimizar os experimentos de produção das substâncias antimicrobianas devido ao elevado gasto de material e esforço, uma nova triagem foi realizada. Os 10 isolados capazes de produzir inibição na bactéria *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 foram postos em teste contra todas as 13 cepas padrões patogênicas.

As culturas utilizadas neste experimento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Caldo Nutriente (meio aplicado na produção das substâncias antimicrobianas). A incubação ocorreu em estufa B.O.D. por 24 horas a 30° C. Após o período de incubação, as treze bactérias patogênicas (cepas) tiveram suas culturas ajustadas a 10^8 UFC/mL e inoculou-se 100 µL de cada, em placas contendo 20 mL de meio Ágar Muller-Hinton. Em seguida foram distribuídos, em cada placa, cinco discos de 6 mm de diâmetro e nestes foram inoculados 10 µL dos isolados. Esse experimento foi realizado em triplicata. Como controle negativo, utilizou-se 10 µL de caldo nutriente.

4.4. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM O SOBRENADANTE

Os 10 isolados que obtiveram resultado positivo no teste de triagem (tópico 4.3) foram utilizados no ensaio da atividade antimicrobiana, descrito por Ebrahimipour (2011).

No total, treze bactérias patogênicas foram utilizadas neste estudo. As cepas Gram positivas utilizadas neste trabalho foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Kocuria rhizophyla* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. E as bactérias Gram negativas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705, *Klebsiella pneumoiniae* ATCC 70063, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio mimicus* ATCC 33653.

As bactérias acima listadas foram inoculadas em tubos contendo 10mL de meio Caldo Nutriente e incubadas a 30°C por 24 horas. Após o fim da incubação, foram ajustados inóculos de 10^8 ufc/mL usando como referência a escala McFarland. Os inóculos ajustados (100 µL) foram semeados por espalhamento em placas contendo 20mL de meio MullerHinton.

Utilizando-se do cultivo da triagem das bactérias isoladas, transferiu-se para micro tubos (de capacidade 1,5mL) 1mL de cada umas das dez bactérias que obtiveram os melhores resultados de inibição. Realizou-se centrifugação a 1300xg por vinte minutos a 4°C e o sobrenadante foi depositado em discos de papel de 6mm de diâmetro nas placas já inoculadas pelas bactérias testes. O objetivo deste teste foi verificar se o sobrenadante puro teria capacidade de inibição ou se seria necessária a realização de extração mais específica.

4.5. EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

O isolamento e a concentração das substâncias inibidora seguiram o método apresentado por Joshi (2008). O pré-inóculo das selecionadas para a produção das substâncias ocorreu em frascos tipo Erlenmeyer, com capacidade para 300mL, contendo 180mL de meio Caldo Nutriente incubados em agitador tipo shaker a 120 rpm a 30°C. Após 24 horas de crescimento, 50mL do cultivo foi transferido para um novo Erlenmeyer de 300mL contendo 130mL de meio Caldo Nutriente, preenchendo assim 60% da capacidade do frasco. Os inóculos foram incubados a 37°C, a 150rpm por 72 horas. Três frascos Erlenmeyers foram utilizados por bactéria totalizando 540mL de cultivo.

Ao final do período de incubação, o material foi centrifugado a 10000xg por 30 minutos a 4°C para extrair o caldo livre de células. A precipitação dos metabólitos produzidos ocorreu através da acidificação do sobrenadante até o pH 2,0 com ácido clorídrico 1M, mensurado através de fitas de pH. Imediatamente após a acidificação observa-se a precipitação de um composto branco. Este foi extraído através de nova centrifugação de 10000xg por 40 minutos a 4°C. O composto, extrato bacteriano, foi concentrado em um micro tubo de 2mL previamente pesado para definir a concentração final de cada extrato. Por fim, os compostos foram diluídos em água Mili-Q ajustada para o pH 8,0 até a concentração 500mg/mL utilizada como estoque.

4.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM OS EXTRATOS

Os extratos prontos foram testados contra todas as 13 bactérias patogênicas. Cultivou-se as patogênicas em tubos contendo 10mL de meio Caldo Nutriente incubando o cultivo em estufa tipo B.O.D a 30°C por 24 horas. Em seguida, ajustou-se sua concentração para 10^8 ufc e 100µl foram semeados em Ágar Muller-Hinton. Cinco discos de 6mm foram colocados equidistantes nas placas. Uma parte

de cada estoque foi diluída até as concentrações 200mg/mL, 100mg/mL, 50mg/mL, 25mg/mL e 10mg/mL. Nos discos foram inseridos 10µl de cada diluição. A incubação das placas ocorreu em estufa tipo B.O.D por 18-24 horas. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS

Segue abaixo os protocolos de extração do DNA, reação em cadeia da polimerase, purificação dos amplificadores e sequenciamento das dez cepas produtoras de substâncias antimicrobianas.

4.7.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do kit Wizard[®] de purificação de DNA genômico - Promega. Inicialmente, 2 mL do cultivo de 18 horas foi concentrado por centrifugações em micro tubos, com capacidade total de 2 mL, a 11 000 xg, por 2 minutos em temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi lavado em 480 µL de 50 mM de EDTA para remover os resíduos do meio. Nova centrifugação foi realizada e o EDTA descartado. A etapa de lise iniciou-se com a adição de 600 µL da solução de lise nucléica do kit, homogeneizando gentilmente com o aglomerado de células, em seguida incubou-se a 80° C por cinco minutos deixando o micro tubo resfriar em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 3 µL da solução de RNase e a mistura foi incubada a 37° C por 45 minutos, sendo esfriada em temperatura ambiente.

A próxima etapa começou com a adição de 200 µL da solução de precipitação das proteínas, sendo todo o conjunto vortexeado por alguns segundos, e incubado no gelo por cinco minutos. Em seguida, o preparo foi centrifugado a 11 000 xg por três minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo micro tubo de 1,5 mL de capacidade.

A etapa de precipitação do DNA iniciou-se adicionando no micro tubo 600 µL de isopropanol em temperatura ambiente. O sistema foi misturado gentilmente. Centrifugou-se novamente a 11 000 xg por 3 minutos em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 600 µL de etanol 70 % a temperatura ambiente e misturou-se gentilmente. Uma última centrifugação a 11 000 xg por 2 minutos foi realizada. Em seguida, o etanol foi descartado e o resíduo de etanol foi removido através de

secagem na estufa a 30° C, por no máximo 30 minutos. O DNA foi reidratado com 50 µL da solução de reidratação por 1 hora a 65° C.

A confirmação da extração foi realizada através de observação do DNA em gel de agarose a 1 %. Para tanto, o gel foi preparado adicionando-se 40 mL de tampão TAE e 0,4 g de agarose. A solução foi aquecida até a dissolução dos grânulos de agarose e após breve resfriamento, foram acrescentados 7,5 µL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Em seguida aplicou-se a solução em uma forma padrão de eletroforese junto ao pente para formação dos poços. Após polimerização do gel, as amostras foram aplicadas nos poços junto ao tampão de corrida 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™), sendo 5 µL da amostra e 2 µL do tampão. A visualização do gel foi realizada sob um transiluminador de luz ultravioleta (UV).

4.7.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada pelo kit Taq DNA Polymerase, Brasil (Life Technologies™), em micro tubos de 200 µL. Os *primers* utilizados foram os *primers* de Eubacteria universais fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'). Os valores do MIX para uma reação são: Tampão 10 X (5,00 µL); MgCl₂ (1,50 µL); dNTP 10 mM (1,00 µL); *primer* fD1 (1,25 µL); *primer* rD2 (1,25 µL); Taq polimerase (0,40 µL); DNA (10,00 µL); água ultra pura (29,60 µL). O volume final atingiu 50 µL. O procedimento utilizado para o ciclo do PCR foi: 95° C por 3 minutos; 35 ciclos de 95° C por 45 segundos, 59° C por 45 segundos, 72° C por 1 minuto; e 5 minutos de extensão final por 72° C. O DNA amplificado foi armazenado a 4° C.

Para a confirmação da amplificação, o produto do PCR foi visualizado em gel de agarose a 2 %, seguindo os demais procedimentos como já descrito.

4.7.3. Purificação dos produtos de PCR

A purificação foi realizada através da Enzima ExoSAP-IT formulado pela empresa GE. O ExoSAP-IT é composto pela enzima Exonuclease I e por um tampão alcalino fosfatado. O protocolo seguiu recomendações do fabricante, que recomenda a adição de 2 µL da Enzima ExoSAP-IT para cada 5 µL do amplificado. O MIX foi incubado a 37° C por 15 minutos. Após este período, a enzima foi inativada por aquecimento a 80° C por 15 minutos. Terminado o período de incubação, o DNA purificado foi utilizado para o sequenciamento das amostras.

4.7.4. Sequenciamento das amostras

As amostras foram sequenciadas utilizando os mesmos *primers* da amplificação do DNA já citados, fD1 e rP2. O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de Sanger e as reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, composto por, 4,1 µL de água ultrapura, 2,0 µl do tampão de sequenciamento 5X (Applied biosystems), 0,4 µL de *primer* (10 pM/µL), 2,5 µL de DNA da amostra e 1,0 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). As amplificações ocorreram em um termociclador “peqSTAR 96 universal gradiente”, de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de três etapas: desnaturação (96 ° C, 10 s), anelamento de acordo com os *primers* e extensão (65 ° C, 4 min). As etapas seguintes foram: a precipitação com a adição de 40 µl de isopropanol 65 %, centrifugando a 4 000 rpm por 40 min. Em seguida o DNA foi lavado com 200 µl de etanol 60%, após a lavagem o DNA foi ressuspensionado em 10 µL de formamida e aquecido a 93 °C por 3 min, resfriado rapidamente em freezer -20°C. Posteriormente, as mostras foram submetidas à eletroforese em sequenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 30 seg. A condição de eletroforese foi de 12 Kv por 120 min.

A verificação da qualidade das sequências geradas e a edição de acordo com o eletroforetograma gerado foi realizada pelo software MEGA 5. Estas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o bancos de dados públicos, como o GenBank/NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) e a ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools”. As sequências foram avaliadas quanto à identidade dos resultados propostos pelo banco de dados.

4.8. TRIAGEM DE BACTERIOCINAS POR ANÁLISE MOLECULAR

No intuito de identificar a produção de bacteriocinas pelos cinco isolados que apresentaram melhor atividade antimicrobiana nos ensaios realizados neste estudo, foram realizadas análises por PCR utilizando *primers* específicos de bacteriocinas apresentados na Tabela 01. Essas substâncias já conhecidas foram estudadas por

outros autores como apresentado na tabela, inclusive quanto aos ensaios de controles positivos para amplificação dos iniciadores.

Para este ensaio, a extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando o kit Wizard[®] de purificação de DNA genômico – Promega, como já descrito no item 4.9.1. A amplificação foi realizada utilizando o kit KAPATaq DNA polymerase –KAPABIOSYSTEMS, com os seguintes valores para MIX de 20µL: 2µL de 10x buffer with Mg²⁺; 0,4µL de dNTPs (10mM); 0,8µL de cada *primer* (Fwd e Rev); 0,1µL do *template*; 0,08µL da KAPATaq (5U/µL); complemento para 20µL com água ultra pura. As condições do PCR seguiu a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por 3 min.; seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 seg., anelamento com temperatura específica para cada primer por 30 seg. e 72°C por 1 min.; finalizando com extensão a 72°C por 2 min., DNA foi armazenado a 4°C.

Tabela 1. Sequências dos *primers* de bacteriocinas utilizados na análise por PCR.

| Bacteriocina (Gene) | Sequência (5´- 3´) | Amplicon | Referência |
|--------------------------------|--|-----------------|-------------------|
| Subtilin(Spa) | ACTATGAATCAATGGAAGG TTGCAGTTACAAGTTAGTG | 370 pb | BARBOSA, 2010 |
| Subtilosin (Sob) | GGTTGTGCAACATGCTCGAT CTCAGGAAGCTGGTAACTC | 300 pb | BARBOSA, 2010 |
| Sublancin (Sun) | GTGTGCTGCGTTGTGGCTACAA TTGACGAGATACAAGTAGTCC | 230 pb | BARBOSA, 2010 |
| Coagulín (CoaA) | GGTGGTAAATACTACGGTAATGGGGT GTGTCTAAATACTGGTTGATTCGT | ~600 pb | RIAZI, 2009 |
| Mersacidin (MrsA) | CTTAATAAGGGGGTAATAC | 270 pb | PRIETO, 2012 |

| | | | |
|------------------------------------|---|--------|--------------|
| | TAGGCTGTTCCCTTCTGAAGG | | |
| Lichenicidin (Bli04127) | GGAAATGATTCTTTCATGG TTAGTTACAGCTTGGCATG | 215 pb | PRIETO, 2012 |
| Ericin A (EriSa) | TGTCAAAGTTTCGATGACTTC TCAGCACTTAGCAAATGTTG | 171 pb | PRIETO, 2012 |

Dessa forma, os isolados 21, 29, 38, 50 e 54 foram amplificados, em duplicata, com cada um dos *primers* apresentados na tabela anterior para verificação da presença de sequências referentes às bacteriocinas citadas. Estes foram escolhidos por serem os de melhor produção (no caso dos isolados 21, 50 e 54) e por apresentarem colônias com características de *Bacillus* (29 e 38). Em seguida os produtos amplificados foram submetidos em análise por gel de agarose junto a um marcador de peso molecular (DNA Ladder) para certificar a especificidade.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA E COLETA DAS AMOSTRAS

5.1.1. LOCALIZAÇÃO

A localização dos três pontos de coleta nas praias foi definida através de divisão visual das cinco praias em três setores. A cada retirada de amostra registrou-se sua localização com GPS. A Tabela02 indica os registros:

Tabela 2. Localização dos pontos de coleta nas cinco praias, Bahia, 2013.

| Praias | Amostra 01 | Amostra 02 | Amostra 03 |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| São Francisco do Conde | 12° 53' 08.317" S | 12° 53' 08.317" S | 12° 53' 08.317" S |
| | 38° 26' 13.905" W | 38° 26' 13.905" W | 38° 26' 13.905" W |
| Saubara | 12° 46' 41.016" S | 12° 46' 37.473" S | 12° 46' 31.146" S |
| | 38° 46' 07.822" W | 38° 46' 05.629" W | 38° 46' 01.545" W |
| Maragogipe | 12° 46' 40.972" S | 12° 46' 51.163" S | 12° 46' 51.162" S |
| | 38° 54' 39.652" W | 38° 54' 32.880" W | 38° 54' 32.982" W |
| Salinas das Margaridas | 12° 52' 19.082" S | 12° 52' 19.634" S | 12° 52' 22.169" S |
| | 38° 45' 54.067" W | 38° 45' 56.112" W | 38° 45' 56.112" W |
| Vera Cruz | 13° 06' 10.743" S | 13° 06' 10.745" S | 13° 06' 07.064" S |
| | 38° 45' 10.221" W | 38° 45' 09.496" W | 38° 45' 08.382" W |

As imagens das praias onde as amostras de solo foram coletadas estão representadas na Figura 02.

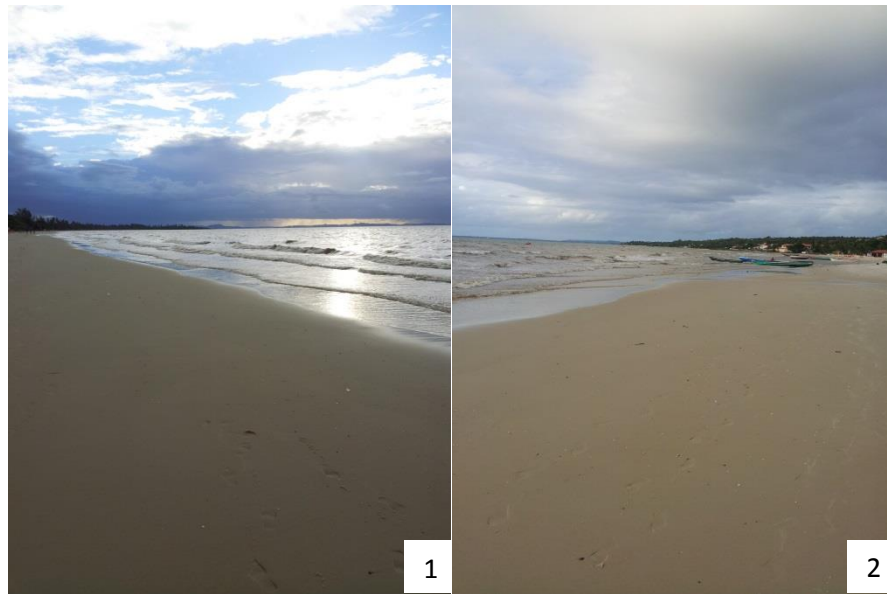




Figura 2. Imagens das praias São Francisco do Conde (1), Saubara (2), Maragogipe (3), Salinas das Margaridas (4) e Vera Cruz (5), Bahia, 2013.

5.1.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Moustafa (2006), afirma que a camada superficial do solo, por volta de 10cm de profundidade, possui a maior densidade de microrganismos.

À vista disso, realizou-se a coleta do solo com tubos tipo Falcon de 50mL de capacidade em razão destes possuírem a dimensão de 11,00 cm de comprimento e 3,00cm de largura, como demonstrado nas imagens abaixo (Figura 03):

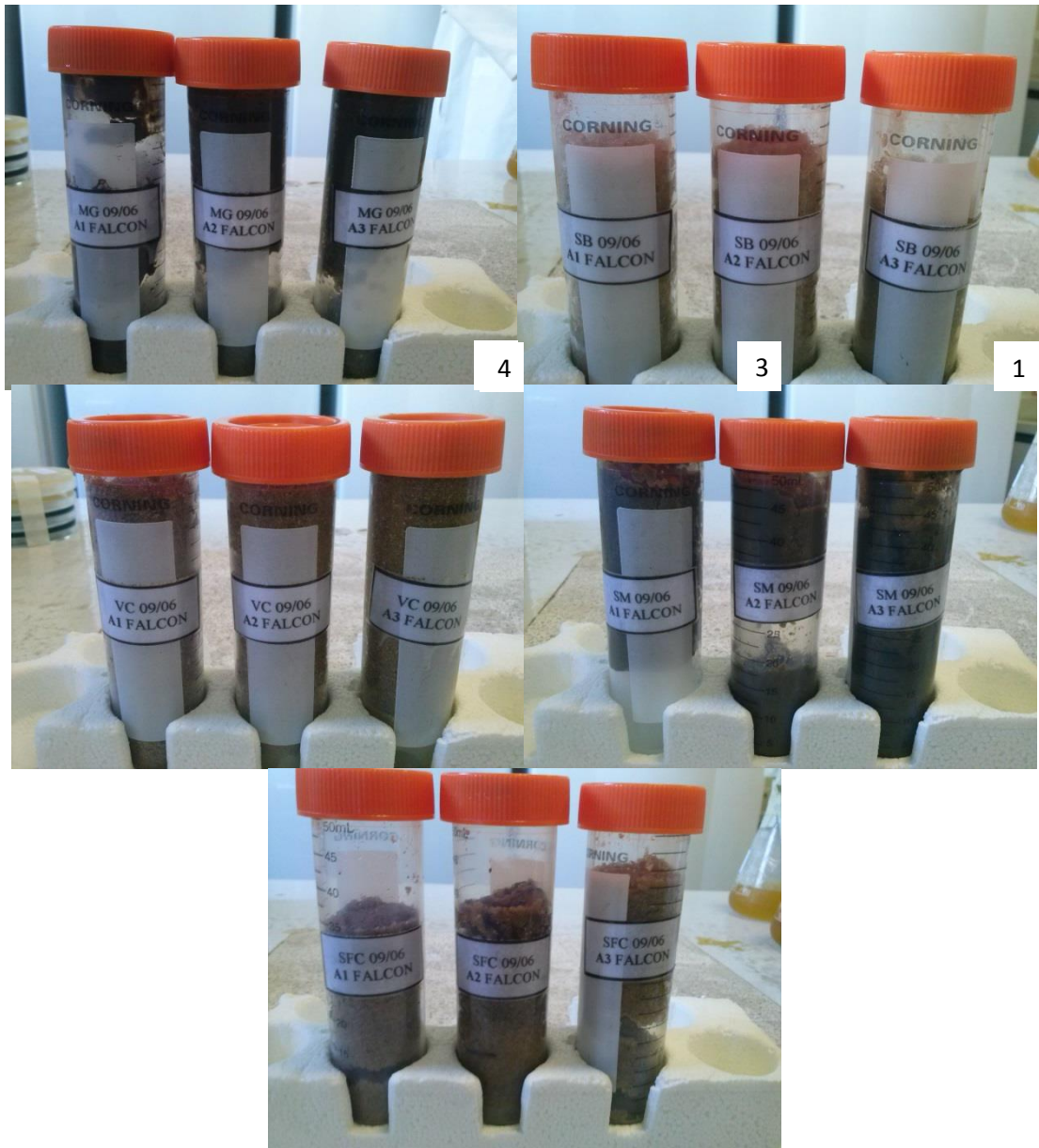


Figura 3. Imagens dos tubos de coleta com amostras de cada praia: São Francisco do Conde – SFC (1), Saubara (2), Vera Cruz (3), Salinas das Margaridas (4), Maragogipe (5).

5.2. MEIOS DE CULTURA E ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

5.2.1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS

Saravanan (2007), Barbeyron (2001) e Satpute (2008), assim como muitos outros autores, utilizam o meio Marinho Zobell para isolamento de bactérias marinhas devido ao fato de simular os nutrientes e sais existentes no ambiente marinho.

O uso do meio Muller-Hinton é comumente utilizado e recomendado para testes de ensaios de atividades antimicrobianas, como visto no trabalho de Caputo (2010),

5.2.2. ISOLAMENTOS DAS BACTÉRIAS

Kolm (2007) objetivou em seu trabalho o isolamento dos coliformes totais do litoral do Paraná, mais especificamente da Baía de Guaratuba. Para tanto, coletou sedimentos de forma estéril e prosseguiu com a mesma metodologia descrita no tópico 4.2.2.

No presente trabalho, o procedimento de isolamento foi realizado em duplicata devido ao elevado número de amostras. As diluições utilizadas mostraram-se ideais por permitirem o surgimento de colônias bacterianas dispersas, facilitando, assim, o isolamento das mesmas. Apesar das placas terem ficado incubadas por 48 horas, com 24 horas de crescimento já se pôde observar grande quantidade de colônias.

O protocolo utilizado para o isolamento das bactérias mostrou-se eficaz para tal feito, porém deixou a desejar em relação ao isolamento de outros microrganismos, como os fungos, apesar de, em 2008, Gomes e colaboradores terem afirmado em seu trabalho de isolamento de fungos filamentosos, em Pernambuco, Brasil, que apenas quinhentas espécies de fungos haviam sido descritas como sendo isoladas de oceanos estuário (GOMES, 2008).

Nas cinco praias onde as coletas foram realizadas, observou-se o crescimento de colônias similares, o que pode indicar que alguns dos microrganismos da BTS estão distribuídos por toda sua extensão. Outras bactérias, porém, somente foram encontradas em algumas praias. No total, 107 colônias foram isoladas, sendo 18 da praia de São Francisco do Conde, 25 de Saubara, 23 de Maragogipe, 20 de Salinas das Margaridas e 21 de Vera Cruz.

O princípio utilizado para o isolamento dessas colônias foi, em primeiro lugar, o de visualizações de possíveis inibições nas placas originais, como visto nas colônias 38, 42, 47, 58, 101 e 105 entre outras (Figura 04).



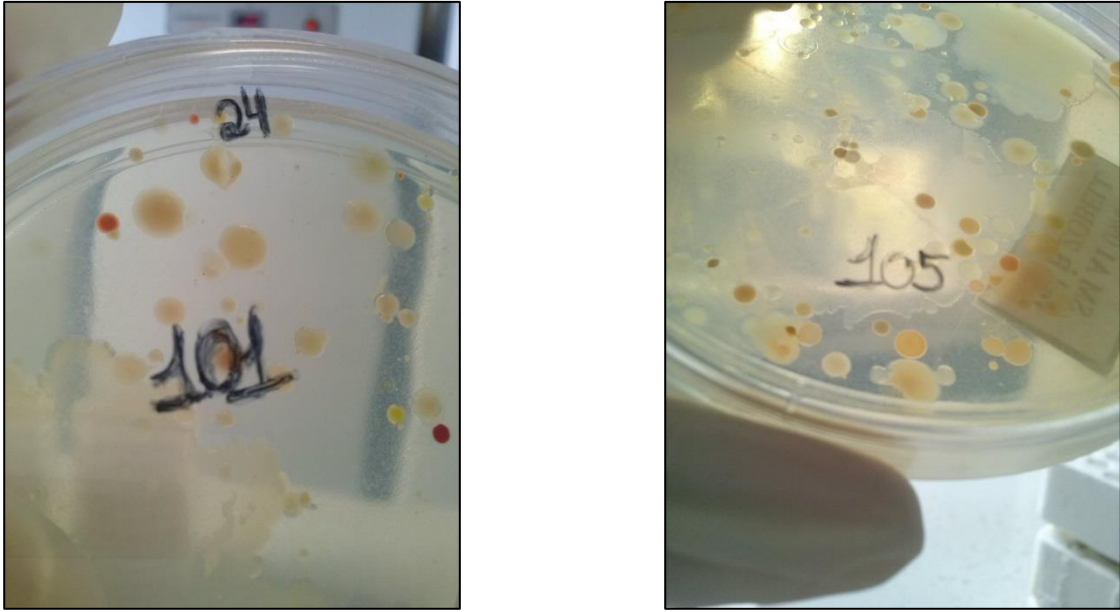
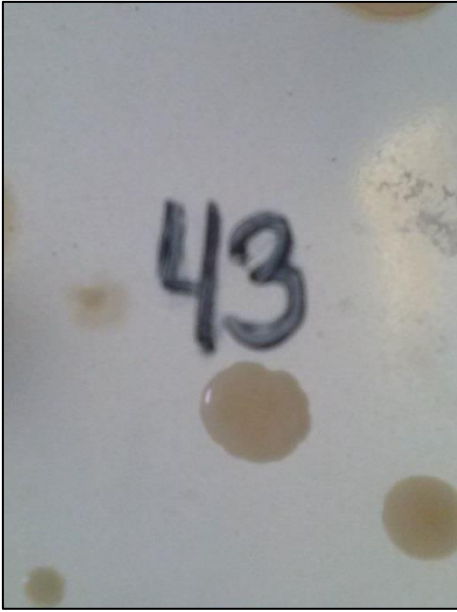


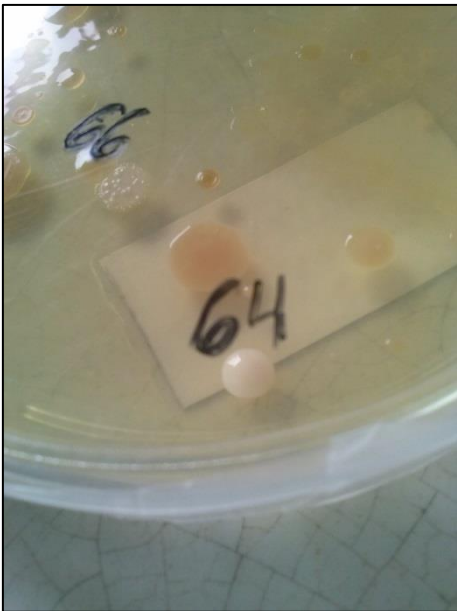
Figura 4. Seleção das colônias nas placas originais com indicação de inibição. Colônias 38, 42, 47, 58, 101 e 105.

Outro critério de isolamento utilizado foi o de coloração e morfologia diferenciadas, como visto nas colônias 04, 07, 09, 13, 28, 39, 43, 50, 52, 56, 57, 59, 64, 69, 72 e 77 (Figura 05).









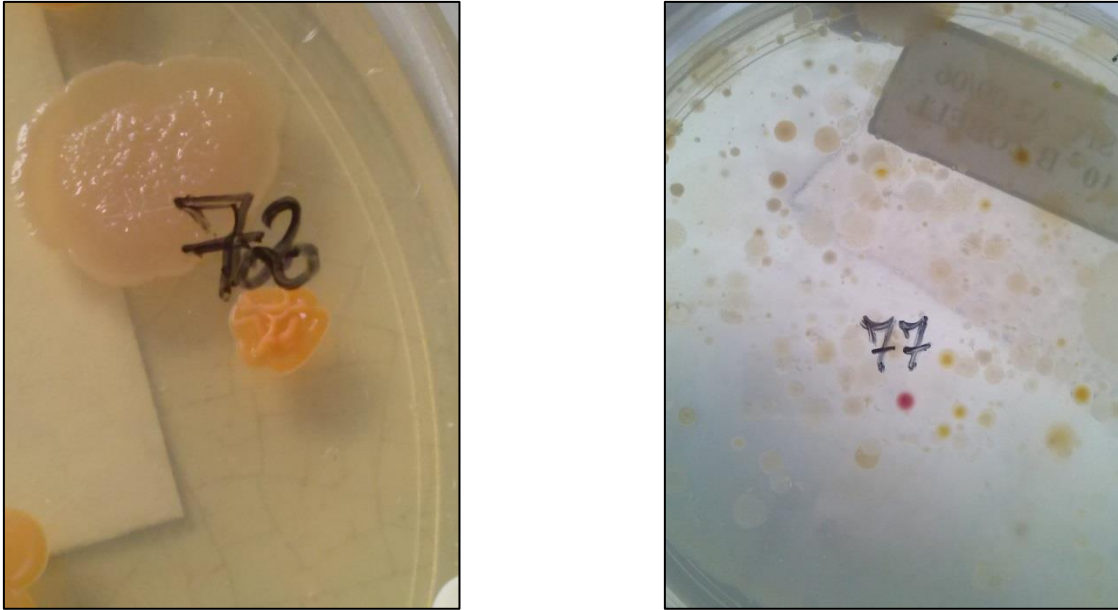


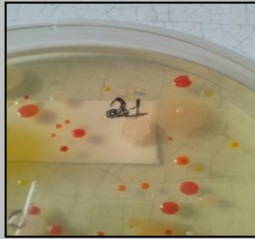


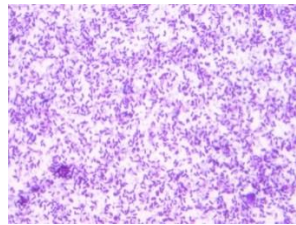

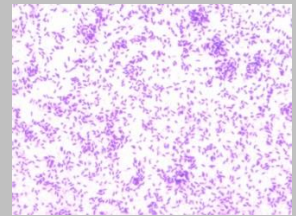

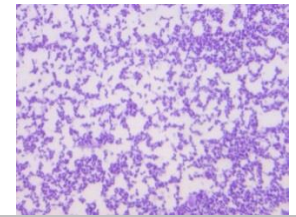

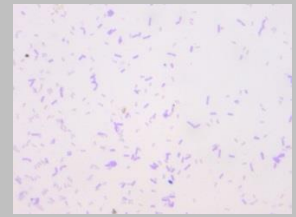


Figura 5.Imagens das colônias selecionadas por sua coloração ou morfologia diferenciada.


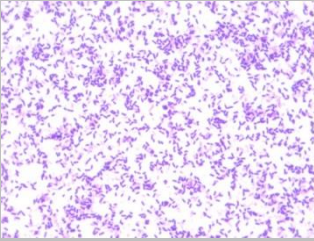

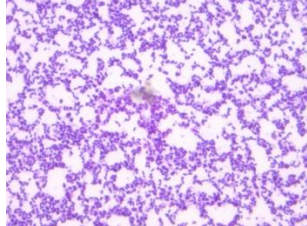

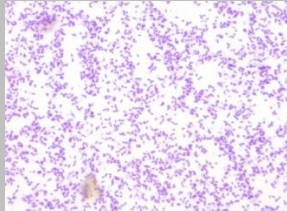

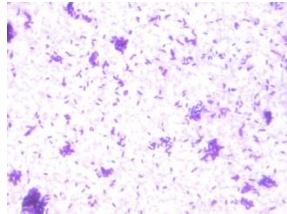
5.2.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A variedade de espécimes encontrada surpreendeu pela diversidade de cores e formas em cada placa de Petri. Como se buscou nas placas originais colônias segregadas, não se obteve dificuldade no isolamento, tendo estado todos os isolados puros no segundo repique.

Apesar dos esforços, após três tentativas, somente 39 dos 107 isolados tiveram os seus Gram definidos devido à incerteza da coloração apresentada pela falta de confiabilidade no *kit* utilizado que também apresentava um volume excessivo de resíduos. Desses 39, 32 foram considerados bacilos Gram positivos pela análise do Gram. Quatro foram considerados bacilos Gram negativos, e três, cocos Gram positivos. Urakawa (1999) estudou a diversidade microbiana no sedimento marinho de uma baía no Japão, onde os dados foram coletados através de biologia molecular. Neste trabalho, Urakawa afirma que existe uma grande diversidade de bactérias Gram positivas neste ambiente. Na Tabela 03 pode-se verificar uma pequena amostra da diversidade encontrada neste trabalho.

Tabela 3. Tabela indicando os resultados da coloração de Gram de dez isolados.

| Isolados | Colônia | Coloração de Gram | Análise do Gram |
|----------|---|--|----------------------|
| 21 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 29 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 38 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 39 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 50 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 53 |  |  | Bacilo Gram positivo |

| | | | |
|-----|---|--|----------------------|
| 54 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 72 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 105 |  |  | Bacilo Gram positivo |
| 107 |  |  | Bacilo Gram positivo |

Observou-se também que muitos dos bacilos Gram positivos apresentavam-se esporulados no Gram, característica comum entre os bacilos (SCHULTZ, 2009). Uma hipótese a ser levantada para explicar este resultado seria o fato de que as técnicas de cultura básica são consideradas inadequadas para o estudo de diversidade de amostras ambientais devido à dificuldade de se reproduzir as condições ideais em laboratório para o cultivo desses microrganismos (WEBSTER, 2001).

5.3. TRIAGEM DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ANTIMICROBIANOS

A cepa utilizada como padrão para o teste de triagem dos isolados produtores de antimicrobianos foi a bactéria *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). A *V. vulnificus* é uma bactéria Gram negativa da família Vibrionaceae, causadora de patologias

em humanos, animais marinhos e corais. Em humanos, é um patógeno oportunista altamente letal e responsável pela maioria dos casos de falecimento por ingestão de frutos do mar nos Estados Unidos. Este microrganismo faz parte da microbiota natural do ambiente marinho, podendo ser isolado na água do mar e em sedimento e animais marinhos (JONES; OLIVER, 2009).

A *Vibrio vulnificus* é um bacilo Gram negativo, halófilo, cuja patogenicidade reflete-se em severo processo inflamatório, podendo gerar septicemia. A escolha desta cepa como padrão ocorreu por este ser um patógeno de humanos, animais marinhos e corais, e por ser a mais conhecida entre as três vibrios utilizadas neste trabalho.

As 107 bactérias foram testadas da seguinte maneira: utilizaram-se seis discos em cada placa objetivando, assim, redução de custos com material. Por se tratar de uma triagem, não foi realizada triplicata. Todas as 107 bactérias cultivadas em meio Marinho Zobell cresceram após 24 horas, tendo sido, então, todas utilizadas no teste. Depositou-se em cada disco 10µl de cada cultivo, em placas previamente semeadas com a bactéria *Vibrio vulnificus* e esperava-se como resultado positivo a formação de um alo de inibição.

Resultados positivos foram encontrados em dez isolados, quais sejam 21, 29, 38, 39, 50, 53, 54, 72, 105 e 107, tendo estes, segundo a análise do Gram, se apresentados como bacilos Gram positivos. As medições dos halos de inibição não puderam ser levadas em consideração devido ao fato de que as bactérias isoladas em meio Marinho Zobell cresceram de forma confluyente para fora do disco. Sendo assim, medir seus halos levaria a resultados não fidedignos. As imagens dos halos de inibição dessas dez bactérias podem ser observadas na Figura 06.





Figura 6. Halos de inibição dos dez isolados contra a bactéria *V. vulnificus*.

A realização deste experimento demandou grande quantidade de material e esforço. Portanto, nova triagem foi realizada a fim de se verificar se os dez isolados selecionados possuíam inibição contra as 13 cepas padrão testadas, já que, inicialmente, só se testou a *Vibrio vulnificus*.

Das 13 bactérias patogênicas utilizadas no teste, somente sete foram inibidas, sendo estas a *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* ATCC 6539P, *S. aureus* ATCC 25923, *V. vulnificus*, *S. saprophyticus* e *K. rizophyla*. Novamente surgiu a dificuldade de medição dos halos devido as colônias terem crescido além do disco. Das dez bactérias isoladas produtoras de substâncias antimicrobianas, três (21, 50 e 54) conseguiram inibir bactérias patogênicas (Tabela 04). Desta forma, é possível afirmar que três bactérias isoladas produzem substâncias antimicrobianas capazes de inibir sete patogênicas, sendo que três eram bacilos Gram negativos (*V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) e quatro cocos Gram positivos (*S. aureus* ATCC 6539P, *S. aureus* ATCC 25923, *S. saprophyticus* e *K. rizophyla*).

Tabela 4. Tabela indicando os resultados dos melhores isolados inibidores.

| Isolados produtores de substâncias antimicrobianas | Cepas patogênicas isoladas |
|--|--|
| Isolado 21 | <i>V. mimicus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S.</i> |

| | |
|--------------------|---|
| | <i>aureus</i> ATCC 6539P, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>V. vulnificus</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>K. rizophyla</i> |
| Isolado 29 | - |
| Isolado 38 | - |
| Isolado 39 | - |
| Isolado 50 | <i>V. mimicus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 6539P, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>V. vulnificus</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>K. rizophyla</i> |
| Isolado 53 | - |
| Isolado 54 | <i>V. mimicus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 6539P, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>V. vulnificus</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>K. rizophyla</i> |
| Isolado 72 | - |
| Isolado 105 | - |
| Isolado 107 | - |

5.4. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM O SOBRENADANTE

Moustafá (2006), Lakshminarayanan (2012) e Ebrahimipour (2011) utilizaram sobrenadante do cultivo de seus isolados a fim de averiguar se estes possuíam alguma atividade antimicrobiana. Ebrahimipour (2011) constatou através deste teste que quatro das suas 20 bactérias isoladas eram produtoras de antimicrobianos, e, para tanto, utilizou como cultura teste a bactéria *Bacillus subtilis*.

Lakshminarayanan (2012) utilizou o sobrenadante filtrado e ajustado para pH 6,5 de culturas isoladas contra bactérias Gram positivas e negativas patogênicas humanas. Neste trabalho, ele isolou 70 000 colônias de 410 amostras fecais e observou que 276 colônias exibiram atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus*

bugaricus (LMG 6901) e *Listeria innocua* (DPC 3572), sendo que, com a primeira, somente 273 colônias obtiveram resultado positivo e, com a segunda, somente três.

O mesmo procedimento foi utilizado por Mustafá (2006), que isolou uma espécie de *Streptomyces* produtora de meroparamicina e a testou contra seis patógenos humanos, entre eles a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). Destas seis, apenas três obtiveram resultados positivos contra o sobrenadante.

Esta dissertação seguiu a mesma metodologia utilizada nestes três trabalhos, utilização do sobrenadante do cultivo de 24 horas dos isolados sobre bactérias patogênicas, porém não foi obtido resultado positivo de inibição com nenhuma dos dez isolados testados sobre as treze bactérias patogênicas. Uma hipótese capaz de justificar este resultado seria a baixa concentração da substância inibidora, sendo então necessária a realização de um novo teste com a mesma, mais concentrada, para a confirmação do resultado negativo.

5.5. EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

A metodologia descrita no presente estudo teve origem no artigo de Joshi (2008). Este autor objetivou a extração de uma substância biosurfactante e antifúngica, produzida pela bactéria *Bacillus subtilis*. No presente caso, a precipitação realizada no pH 2,0, foi ideal, pois possibilitou a extração do componente antimicrobiano no sobrenadante.

No trabalho desenvolvido por Hsieh (2008), objetivando a extração e isolamento da bacteriocina iturina A, também houve acidificação do meio para o pH 2,0 a fim de precipitar a substância desejada. Esta técnica de acidificação é apresentada em outro artigo deste mesmo autor (HSIEH, 2004), que buscou o isolamento de bacteriocinas em geral, demonstrando que esta técnica é comumente utilizada para este objetivo.

No presente trabalho, a acidificação dos sobrenadantes resultantes do cultivo das bactérias produtoras objetivou o isolamento de qualquer substância inibidora, sabendo que se poderia isolar mais de um tipo destas.

Logo após a alteração do pH, que se apresentava no nível 8,0 nas três amostras (isolados 21, 50 e 54), observou-se o decantar de uma substância branca, com granulação fina, a qual foi separada do sobrenadante através de alta centrifugação. Um pouco mais de 500 mL de cultivo Caldo Nutriente das três bactérias produtoras resultaram na produção de 128mg de precipitado para a

bactéria 21, 197 mg de precipitado para a bactéria 50 e 311 mg para a bactéria 54, mostrando que esta última é a melhor produtora entre as três (Tabela 05). A diluição destes precipitados foi efetuada em água Milli-Q, com pH ajustado para 8,0. Porém percebeu-se que ao se acrescentar o solvente (água Milli-Q), este não promoveu a diluição esperada do soluto, tendo os mesmos permanecidos no fundo do recipiente e não em suspensão como se esperava.

Tabela 5. Produção de precipitado por isolado em 500 ml de meio Caldo Nutriente.

| Isolados | Produção de precipitado |
|-------------------|--------------------------------|
| Isolado 21 | 128 mg |
| Isolado 50 | 197 mg |
| Isolado 54 | 311 mg |

5.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COMO EXTRATOS

Objetivando estabelecer uma concentração ideal de inibição, este ensaio foi realizado com as sete bactérias patogênicas selecionadas no tópico 5.8 e o procedimento foi o mesmo descrito no tópico 4.6, em triplicata. Os resultados não demonstraram concretamente qual a menor concentração inibitória neste experimento por apresentar halo de inibição equivalente em todas as concentrações. Contudo, os halos de inibição presentes se mostraram bem definidos e espessos. Somente dois dos três extratos conseguiram inibir as bactérias patogênicas, o extrato 21 e o extrato 50.

O extrato do isolado 21 teve efeito inibidor em duas bactérias patogênicas, a Gram positiva *K. rizophylae* a Gram negativa *V. vulnificus*. Nesta primeira a média dos três halos de inibição para a concentração mais baixa, 10 mg/mL, foi de 9,5 mm, contudo a maior média foi vista na concentração de 25 mg/mL, 11,3 mm. Não ocorreu inibição do extrato na bactéria *V. vulnificus* na concentração de 10 mg/mL. A

maior inibição neste caso ocorreu na concentração de 50 mg/mL, equivalente a 8,0 mm. Os halos podem ser evidenciados na Figura 07.

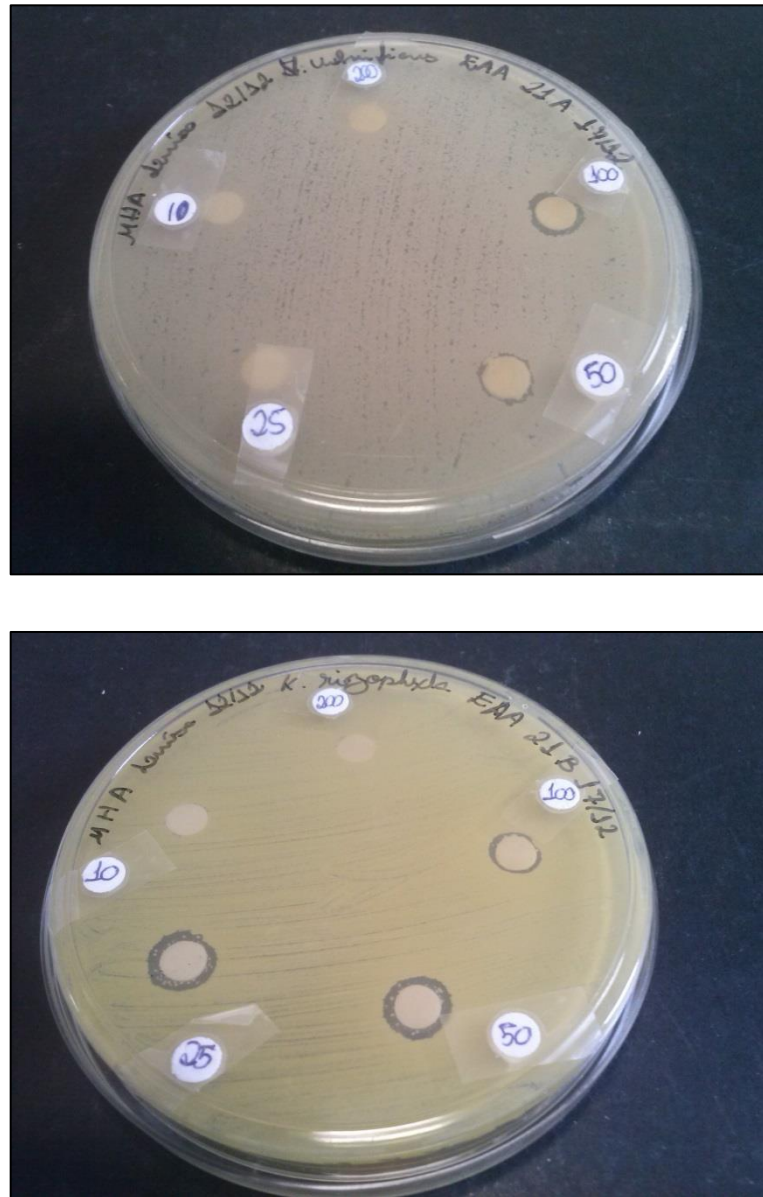


Figura 7. Imagens da inibição realizada pelo extrato do isolado 21 sobre as bactérias patogênicas *V. vulnificus* e *K. rizophyla*, respectivamente.

O extrato de isolado 50 conseguiu inibir o crescimento ao redor do disco da bactéria *K. rizophyla*. A média dos halos de inibição na concentração 10 mg/mL foi de 7,3 mm. A maior inibição foi observada na concentração de 50 mg/mL, com média de halos de 7,7 mm. Estes resultados não conclusivos podem ser justificados

por um fato já observado no item superior, a diluição não eficaz dos extratos pela água Mili-Q. Os extratos foram homogeneizados antes de serem inoculados nos discos, porém a solução se desfazia rapidamente.

5.7. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS

A extração de DNA genômico, seguido da amplificação por PCR foi eficiente em nove dos dez isolados: 29, 38, 39, 50, 53, 54, 72, 105 e 107; apresentando concentração ideal para o sequenciamento. O isolado 21, mesmo com repetitivas tentativas, apresentou dificuldade na extração do seu DNA, apresentando sempre baixa concentração mesmo após amplificação, o que impossibilitou sua identificação neste momento. As baixas concentrações mantidas do isolado 21, mesmo após a amplificação, foram avaliadas pelas bandas de DNA reveladas pela eletroforese em gel de agarose, auxiliado por marcadores de peso molecular. Da mesma forma foram avaliadas as concentrações para os demais isolados, porém, estes apresentaram concentração satisfatória para continuação das análises por sequenciamento.

Apesar da baixa concentração de DNA do isolado 21, todas as amostras foram purificadas com a enzima ExoSAP-IT, quantificadas e encaminhadas para sequenciamento, com já descrito anteriormente.

O sequenciamento revelou a provável identidade de oito das dez amostras (29, 38, 50, 53, 54, 72, 105 e 107). A amostra 29 apresentou a identidade de 100 % com seis espécies diferentes do gênero *Bacillus*: *Bacillus* sp., *Bacillus altitudinis*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus safensis*. A amostra 38 apresentou identidade de 100% com gênero *Bacillus* sp.

Resultado semelhante foi observado nas bactérias: 50, cuja identidade coincidiu, em 100%, com quatro espécies do gênero *Bacillus*: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus tequilensis*; 53, cuja identidade coincidiu, em 100 %, com as espécies *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* e *Kocuria rhizophyla*; 54, cuja identidade coincidiu, em 100%, com três espécies de *Bacillus*: *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp. e *Bacillus Safensis*; 72, cuja entidade coincidiu, em 100 %, com três *Bacillus*: *Bacillus* sp., *Bacillus altitudinis* e *Bacillus aerophilus*; 105, cuja identidade coincidiu, em 100 %, com cinco espécies de *Bacillus*: *Bacillus* sp., *Bacillus altitudinis*,

Bacillus aerophilus, *Bacillus pumilus* e *Bacillus stratosphericus*; e 107, cuja identidade coincidiu, em 100 %, com quatro espécies de *Bacillus*: *Bacillus sp.*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus aerophilus* e *Bacillus stratosphericus*. A tabela 04 apresenta os resultados listados de maneira mais clara.

Tabela 6. Resultado do sequenciamento das bactérias isoladas neste trabalho.

| Isolados | Resultado do seqüenciamento |
|--------------------|---|
| Isolado 29 | <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus altitudinis</i> , <i>Bacillus aerophilus</i> , <i>Bacillus stratosphericus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> e <i>Bacillus safensis</i> |
| Isolado 38 | <i>Bacillus SP</i> |
| Isolado 50 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus methylotrophicus</i> e <i>Bacillus tequilensis</i> |
| Isolado 53 | <i>Bacillus sp.</i> , <i>Lysinibacillus sp.</i> , <i>Lysinibacillus sphaericus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> e <i>Kocuria rhizophyla</i> |
| Isolado 54 | <i>Bacillus</i> : <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus sp.</i> e <i>Bacillus Safensis</i> |
| Isolado 72 | <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus altitudinis</i> e <i>Bacillus aerophilus</i> |
| Isolado 105 | <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus altitudinis</i> , <i>Bacillus aerophilus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> e <i>Bacillus stratosphericus</i> |
| Isolado 107 | <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus altitudinis</i> , <i>Bacillus aerophilus</i> e <i>Bacillus stratosphericus</i> |

Pôde-se observar claramente a predominância do gênero *Bacillus* entre as bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas. Inclusive uma das principais características destas bactérias é produção de componentes antimicrobianos capazes de inibir fungos e bactérias (Baruzzi, 2011). *Bacillus* são bactérias Gram positivas aeróbicas, formadoras de esporos, cuja principal característica é a produção

de grande diversidade de substâncias antimicrobianas. Estas bactérias são encontradas praticamente em qualquer ambiente, desde solos marinhos até no trato gastrointestinal de insetos e mamíferos (ABRIOUEL, 2010). A sua grande distribuição espacial é devida a sua capacidade de formação de esporos. Estes, inclusive, puderam ser observados na análise do Gram descrita acima.

Em diferentes espécies de *Bacillus* foram encontrados novos tipos de bacteriocinas, tendo os seus nomes relacionados à espécie produtora. Pode-se citar, como exemplo, a bactéria *Bacillus subtilis*, produtora da bacteriocina subtilin; a *Bacillus coagulans*, produtora da bacteriocina coagulin; e a *Bacillus cereus*, produtora da substância cerecin 7. Aunpad (2007) descreveu a descoberta de uma nova bacteriocina extraída da bactéria *Bacillus pumilus*, nomeada como pumilicin 4. O foco do seu estudo foi a descoberta de novas bacteriocinas. Para tanto, ele coletou amostras de solo e água com o objetivo de isolar novas bactérias produtoras de antimicrobianos. Como resultado, isolou a bactéria *Bacillus pumilus*, capaz de inibir a bactéria *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA). Ao final dos experimentos, Aunpad (2007) descobriu que a inibição era realizada pela bacteriocina pumilicin 4, nunca descrita anteriormente.

5.8. TRIAGEM DE BACTERIOCINAS POR ANÁLISE MOLECULAR

Dos cinco isolados selecionados para a produção de antimicrobianos, quatro apresentaram amplificação de regiões referente a genes de bacteriocinas, que foram apresentados na Tabela 01 (Item 4.8). Os isolados 21, 29, 38 e 50 que apresentaram atividade antimicrobiana neste estudo, obtiveram amplificação positiva para o gene EriSa, referente a bacteriocina Ericina A (Tabela 06). Estudos relatam a produção de ericina por estirpes de *Bacillus subtilis* A1/3. Este peptídeo apresenta duas isoformas (A e S) que são codificadas pelos genes estruturais *eriA* e *eriS*. A ericina A tem uma organização química diferente, com 16 substituições de aminoácidos em comparação com ericina S, apresentando uma atividade antimicrobiana um pouco diferente. Sequências desses genes estão intimamente relacionados à subtilina (STEIN, 2005).

A ericina é uma das mais comuns bacteriocinas encontradas no gênero *Bacillus*, tendo sido este isolado de várias espécies desse gênero (CHATTERJEE, 2005). Neste estudo, observou-se que os isolados 21, 29, 38 e 50, identificadas molecularmente como sendo *Bacillus altitudinis* (isolado 29), *Bacillus sp.* (isolado 38)

e *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 50). O isolado 21 não foi identificado molecularmente.

Baruzzi (2011) comprovou a inibição dessa substância contra a bactéria *Clavibacter michiganensis*. Nesse estudo, pôde-se atestar que as bactérias prováveis produtoras de ericina conseguem inibir sete bactérias patogênicas diretamente, sendo que a 21 conseguiu inibir a *K. rizophyla* e também a *V. vulnificus* através de seu extrato.

Tabela 7. Amplificação das regiões referentes a bacteriocinas por bactérias com atividade antibacteriana.

| Bacteriocina (Gene) | Isolados | | | | |
|----------------------------|----------|----|----|----|----|
| | 21 | 29 | 38 | 50 | 54 |
| Subtilin (Spa) | - | - | - | - | - |
| Subtilosin (Sob) | - | - | - | - | + |
| Sublancin (Sun) | - | - | - | - | - |
| Coagulin (CoaA) | - | - | - | - | - |
| Mersacidin (MrsA) | - | - | - | - | + |
| Lichenicidin (Bli04127) | - | - | - | - | - |
| Ericin A (EriSa) | + | + | + | + | - |

O isolado 54, apesar de não apresentar amplificação para ericina A, apresentou amplificação específica para dois outros genes, *Sob* e *MrsA* referente a subtilosina e mersacidina respectivamente (Tabela 06). A análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados, com resultado positivo, está representada na Figura 08.

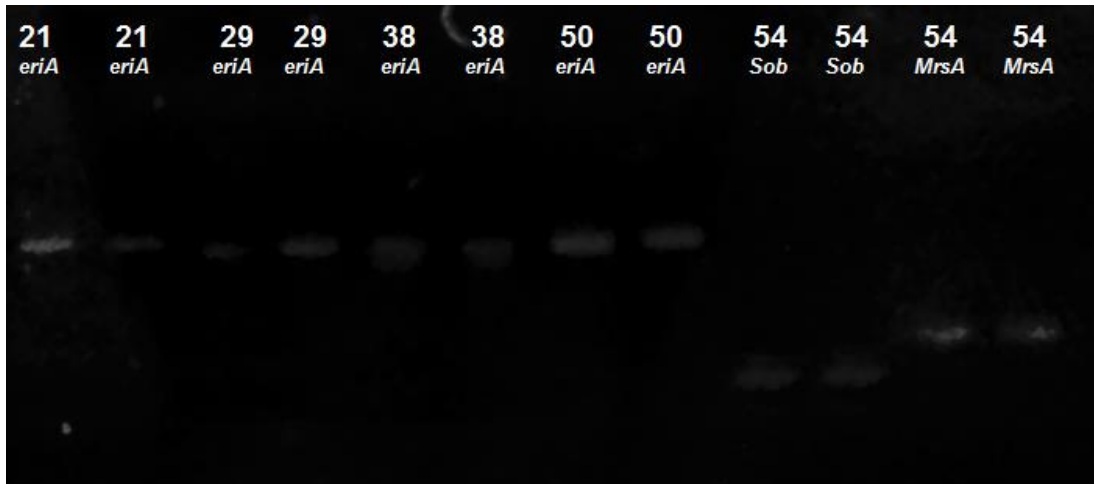


Figura 8. Eletroforese dos produtos amplificados referentes aos *primers* de Ericina A (*eriA*), Subtilosina (*Sob*) e Mersacidina (*MrsA*), pelos isolados 21, 29, 38, 50 e 54.

A mersacidina é um dos menores antibióticos que existem e possuem uma estrutura globular. Chatterjee (2005) afirma que esta estrutura possui atividade antagonista contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (MRSA), semelhante inibição causada pelo antibiótico vancomicina. Neste estudo, observou-se que o isolado 54, identificado como sendo *Bacillus pumillus*, possui o gene característico para este antibiótico e inibiu inicialmente por contato direto as bactérias *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6539P), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus saprophyticus* e *Kocuria rizophyla*.

A subtilosina é um peptídeo cíclico que contém grupos de cisteína e resíduos de aminoácidos na sua conformação. É conhecida por ter uma região altamente conservada e por ser sintetizada no ribossomo. Essa bacteriocina mostrou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Listeria monocitogenes*, *Gardnerella vaginalis* e *Streptococcus agalactiae*. Mostrou também atividade antimicrobiana hemolítica contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus carnosus*, *Listeria monocitogenes* (ABRIOUEL, 2010).

Neste trabalho o isolado 54 apresentou banda no gel de agarose indicando possível produção da bacteriocina subtilosina, tendo esse conseguido inibir as sete bactérias patogênicas listadas acima.

Todos os outros ensaios de PCR para as outras bacteriocinas apresentadas falharam para gerar produtos de amplificação de tamanhos apropriados a partir dos isolados. Os resultados das amplificações indicam uma possível produção das bacteriocinas ericina, mersacidina e subtilosina pelas bactérias isoladas neste trabalho. Porém, para a validação deste resultado é necessário o sequenciamento destes amplificados a fim de se comparar o seu peso molecular efetivo com o dos indicados nas referências (PIETRO, 2012).

6. CONCLUSÃO

Deste trabalho, conclui-se que a biodiversidade microbiana da Baía de Todos os Santos deve ser mais explorada, pois a quantidade de material encontrado neste trabalho revelou um potencial extraordinário de pesquisas a serem realizadas tanto na área de bioprospecção como na de taxonomia.

A bioprospecção de bactérias ambientais revela, a cada estudo, resultados compensadores de todos os esforços empreendidos na pesquisa. Assim, mesmo nos casos em que os compostos antimicrobianos encontrados já sejam descritos, a descoberta de novos ambientes e fontes abrem novas possibilidades de estudo, proporcionando novos campos de exploração, onde novas substâncias podem ser encontradas.

Os *Bacillus* apresentaram-se, da mesma forma que em outros estudos, como uma fonte promissora de busca de novos antimicrobianos. Devido a sua versatilidade em ambientes habitados, as adaptações que estes sofrem para se adaptarem ao meio permitem que sejam usados como fonte de vários produtos bioprospectores. Neste trabalho, o encontro destas bactérias veio a confirmar sua importância na bioprospecção de compostos bioativos.

Através da biologia moléculas, com o uso de primers específicos para a identificação de bacteriocinas produzidas por *Bacillus*, constatou-se uma possível identificação das substâncias inibidoras como sendo ericina, mersacidina e subtilosina. A confirmação desse resultado exige sequenciamento dos amplificados para a comparação do seu peso molecular.

REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H. et al. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocinas*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 35, p. 201–232, 2011.

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

BARBEYRON, T. et al. *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of *Flavobacteriaceae* isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 985–997, 2001.

BARROS, F. et al. Habitats Bentônicos na Baía de Todos os Santos. **Rev. Virtual Quim.**, n. 4, v. 5, p. 551–565, 2012.

BARUZZI, F. et al. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, A. Méndez-Vilas (Ed.), p. 1102-1111, 2011.

BECKER, K. et al. *Kocuria rhizophila* Adds to the Emerging Spectrum of Micrococccas Species Involved in Human Infection. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 10, p. 3537-3539, out. 2008.

BEJ, A. K. et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, n. 3, p. 215–225, jun. 1999.

BUERISV. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, p. 839–844, nov. 2007.

BUERIS, V. et al. Bactéria Patogênica. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 21, p. 186.

CAMPOS, R. et al. Hypophysectomy and Neurointermediate Pituitary Lobectomy Reduce Serum Immunoglobulin M (IgM) and IgG and Intestinal IgA Responses to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Rats. **INFECTION AND IMMUNITY**, p. 1883–1889 Vol. 74, No. 3, Mar. 2006.

CAPUTO, L. et al. Antimicrobial activity of a meat-borne *Bacillus subtilis* strain against food pathogens. **Eur Food Res Technol**, v. 232, p. 183–189, 2011.

CELINO, J. J.; QUEIROZ, A. F. de S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. **R. Esc. Minas**, Ouro Preto, v. 59, n. 3, p. 265-270, jul./set. 2006.

CHATTERJEE, C. et al. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. **Chemical Reviews**, Vol. 105, No. 2, 2005.

DANIELS, N. A. *Vibrio vulnificus* oysters: pearls and perils. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 6, p. 788-792, mar. 2011.

DARABPOUR, E. et al. Isolation of an antibiotic producer *Pseudomonas* sp. from the Persian Gulf. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 318-321, 2010.

DELEO, F. R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B. N.; CHAMBERS, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557-68, maio 2010.

EBRAHIMIPOUR, G. et al. Evaluation of antimicrobial substance produced by a bacterium isolated from *Parmacella ibérica*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 131-140, 2011.

ELEXSON, N. et al. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 378–385, jan. 2014.

EL-NAGGAR, M. Y.; EL-ASSAR, S. A.; ABDUL-GAWAD, S. M. Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p.432–438, ago. 2006.

GOMES, D. N. F. et al. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 3, p. 577–582, 2008.

HATJE, V.; ANDRADE, J. B. de. **Baía de Todos os Santos**: aspectos oceanográficos. Salvador: EDUFBA, 2009. 306 p.

HSIEH, F. et al. Comparing Methods for Identifying Bacillus Strains Capable of Producing the Antifungal Lipopeptide Iturin A. **Curr Microbiol**, v. 56, p. 1–5, 2008.

HSIEH, F. et al. Rapid Detection and Characterization of Surfactin-Producing *Bacillus subtilis* and Closely Related Species Based on PCR. **Current Microbiology**, v. 49, p. 186–191, 2004.

JESUS, R. S.; PROST, C. Importância da Atividade Artesanal de Mariscagem para as Populações nos Municípios de Madre de Deus e Saubara, Bahia. **GEOUSP - Espaço e Tempo**, São Paulo, n. 30, p. 123–137, 2011.

JONES, M. K.; OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 1723–1733, maio 2009.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4603–4608, jul. 2008.

KOLM, H. E.; SANTOS, P. R. N. de M. dos; SAUTTER, K. D. Bacteria in water and sediments of guaratuba bay, Paraná, Brazil. **Tropical Oceanography** (Revista online), Recife, v. 35, n. 1, p. 51-69, 2007.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KURODA, M. et al. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. **PNAS**, v. 102, n. 37, p. 13272–13277, 2005.

LAKSHMINARAYANAN, B. et al. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the intestinal microbiota of elderly Irish subjects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 886-898, 2013.

LEE, J. et al. Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhIA) and cytotoxicity on fish cell. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, n. 2, p. 269-276, out. 2002.

MAKINO, K. et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. **The Lancet**, v. 361, n. 9359, p. 743–749, mar. 2003.

MATSUOKA, Y. et al. Accurate diagnosis and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: a retrospective study of 12 cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-12, jan./fev. 2013.

MCAULIJE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285–308, 2001.

MCAULIJE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285-308, 2001.

MOISSENET, D. et al. Persistent Bloodstream Infection with *Kocuria rhizophila* Related to a Damaged central Catheter. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1495–1498, abr. 2012.

MOUSTAFA, Y.; EL-NAGGAR, A.; EL-ASSAR M., MEROPARAMYCIN Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 432–438, ago. 2006.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 10, p. 2799–2807, 2006.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, abr. 2009.

PENG SUK, C. et al. Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *V. cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. **Aquaculture**, v. 300, n. 1–4, p. 17–24, fev. 2010.

PHELAN, R. W. Subtilomycin: A New Lantibiotic from *Bacillus subtilis* Strain MMA7 Isolated from the Marine Sponge *Haliclona simulans*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1878-1898, 2013.

PRIETO, M. L. et al. Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus* spp. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2280-2299, out. 2012.

RAMAMURTHY, T.; NAIR, G. B. Bactérias: *Vibrio parahaemolyticus*. **Enciclopédia de Segurança Alimentar**, p. 555-563, 2014.

RODRIGUEZ, R. C. et al. Hypophysectomy and Neurointermediate Pituitary Lobectomy Reduce Serum Immunoglobulin M (IgM) and IgG and Intestinal IgA Responses to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Rats. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1883–1889, mar. 2006.

SARAVANAN, P.; JAYACHANDRAN, S. Preliminary characterization of exopolysaccharides produced by a marine biofilm-forming bacterium

Pseudoalteromonas ruthenica (SBT 003). **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, dez. 2007.

SATPUTE, S. K. et al. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 37, n. 3, p. 243-250, set. 2008.

SCHULTZ, D. et al. Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. **PNAS**, v. 106, n. 50, p. 21027–21034, dez. 2009.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus spp.* para conservação e processamento de alimentos. **Alim.Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 4, p. 403–411, out./dez. 2005.

SOMERVILLE, G. A.; PROCTOR, R. A. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73, p. 233–248, 2009.

SOUTO, F. J. B.; MARTINS, V. S. Conhecimentos etnoecológicos na mariscagem de moluscos bivalves no Manguezal do Distrito de Acupe, Santo Amaro – BA. **Biotemas**, v. 22, n. 4, p. 207-218, dez. 2009.

STEFANOVA, T. et al. Enhanced resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 1, p. 7–14, jan. 2007.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Mol Microbiol**, 56: 845 – 57. 2005.

TAKARADA, H. et al. Complete Genome Sequence of the Soil Actinomycete *Kocuria rhizophila*. **J Bacteriol**, v. 190, n. 12, p. 4139-4146, jun. 2008.

TEIXEIRA, L. M.; TRABULSI, L. R. Bactéria Patogênica. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 26, p. 213–217.

TEIXEIRA, P. et al. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, n. 2–3, p. 247–251, abril/jun. 2005.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M; BUERIS, V. Bactéria Patogênica. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 175–182, 2005.

URAKAWA, H.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. **Microbiology**, v. 145, p. 3305–3315, 1999.

VALAN ARASU, M. et al. Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: Bay of Bengal India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 803-810, 2012.

WALKER, J. N. et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS Two-Component System Is a Novel Regulator of Agglutination and Pathogenesis. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 12, dez. 2013.

WEBSTER, N. S. et al. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 434–444, jan. 2001.

WILLIAMS T. C.; FROELICH B.; OLIVER, J. D. A new culture-based method for the improved identification of *Vibrio vulnificus* from environmental samples, reducing the need for molecular confirmation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 3, p. 277–283, jun. 2013.