

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Luciani Cavalini

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR
Bacillus sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE ÁREAS ÚMIDAS**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

Luciani Cavalini
Bacharela em Biomedicina / Universidade Feevale

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR
Bacillus sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE ÁREAS ÚMIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre (a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta
Co-orientadora: Prof. Dr^a Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Cavalini, Luciani
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE
ÁREAS ÚMIDAS / Luciani Cavalini. -- 2019.
56 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Coorientadora: Ana Paula Folmer Corrêa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Atividade antimicrobiana. 2. *Bacillus* sp. 3.
Listeria sp. 4. Peptídeos bioativos. I. Motta, Amanda
de Souza da, orient. II. Corrêa, Ana Paula Folmer,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ofereço à Deus, por ter me dado força nos momentos de fraqueza,
ânimo nos momentos de tristeza e calma nos momentos de desespero.
Por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.
Obrigada Senhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta, pela oportunidade e ensinamentos. Certamente aprendi lições para toda a vida. Obrigada.

Agradeço à Prof. Dr^a Ana Paula Folmer Corrêa por toda a dedicação, o carinho e amizade. Agradeço pelas longas e reconfortantes conversas. Gratidão por todos os ensinamentos compartilhados e auxílio no laboratório. Mesmo longe, se fez presente. Tenho certeza de que terás um caminho brilhante e de muito sucesso.

Aos meus amigos do Laboratório 222C, sim posso me referir a eles assim, pois foram em todos os momentos verdadeiros anjos, compartilhando comigo suas experiências e momentos.

Obrigada especialmente à Letícia e à Tiela. Obrigada Alberto e Camila Coutinho pela companhia até tarde da noite. Obrigada por tornarem esses períodos mais leves.

Agradeço à minha amiga Jéssica Kurtz por toda a alegria e bom humor, pelas risadas, que com certeza alegraram meus dias, e por todo o teu coleguismo. Tu tens um coração de ouro!

Priscila Jankoski, “Pri” tu te tornaste uma irmã, anjo que Deus enviou pra agir em minha vida! Serei eternamente grata por tua amizade e carinho. Obrigada por tudo!

Diego Bertolini, Mari Lobato e Amanda Domingues, obrigada por tudo! Principalmente pela amizade de vocês!

A todos os colegas do PPGMAA, sempre solícitos, e que de uma forma ou outra contribuíram para esta etapa.

Agradeço ao Laboratório Weinmann - Grupo Fleury, pelo incentivo e oportunidade.

Agradeço de coração as minhas colegas da Microbiologia por todos os momentos que compreenderam a minha ausência e me auxiliaram nas tarefas da rotina, para que eu pudesse completar essa etapa. Agradeço à vocês por serem a minha família todos os dias, pelos conselhos, puxões de orelha e carinho. Agradeço aos coordenadores Lauren, Marcelo e Tarissa, que em suas gestões sempre foram compreensivos e me auxiliaram da melhor maneira. Sempre dispostos a me ouvir e aconselhar.

Gratidão à minha “Miga Ana”. Ana Paula Basso, tu foi certamente outro anjo que Deus me enviou. Tuas palavras, mesmo que as vezes não compreendidas no momento, foram ouvidas. Obrigada pela paciência e por tua amizade. Tu foi essencial em todos os momentos.

Laura, Rafael, Pedro e Tiago: a inocência e o amor de vocês me fizeram mais feliz. Obrigada por nunca esquecerem a dinda, mesmo com o pouco tempo que pude fazer parte dos momentos de vocês. Obrigada Fran, Zeca, Joice e Rodrigo por confiarem a mim essa dádiva de ser madrinha de seus filhos!

Ianaê, Karine e Renata, obrigada irmãs!

Agradeço com todo o meu coração aos meus pais José e Nadir, por todas as oportunidades e ensinamentos. Obrigadas pelas palavras de carinho e muitas vezes firmes, que me fizeram enxergar a vida de outra forma e me confortaram em muitos momentos. Obrigada pelas orações e pela compreensão. Sempre entendendo minha ausência e se fizeram presentes de várias formas.

Aos meus irmãos, Renã e Vanessa, só tenho a agradecer pela parceria e pelo amor de vocês. Sempre dispostos a me fazer companhia nos dias em que precisei.

Thomas, obrigada por todo o incentivo. Obrigada por sempre acreditar em mim. Obrigada por ser essa pessoa tão maravilhosa em minha vida.

Jaque e Darlei, obrigada por me acolherem com tanto carinho, obrigada pela hospitalidade e por todo cuidado. Obrigada por serem sempre tão compreensivos e solícitos.

Emílio, Djeine, obrigada por cuidarem da minha família.

Jaque, Dra Patrícia, obrigada por tudo.

Em especial a Deus, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. ISOLADO DE SEDIMENTO DE ÁREAS ÚMIDAS¹

Autor: Luciani Cavalini
Orientadora: Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta
Coorientadora: Prof. Dr^a Ana Paula Correa Folmer

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos derivados de *Bacillus* sp. apresentam potencial de inibição contra vários patógenos, tornando-os um ponto de partida promissor na busca por novas substâncias antimicrobianas. Esses compostos vêm sendo utilizados em diversas áreas, como na qualidade e segurança alimentar, e na saúde humana. Bactérias isoladas de amostras de sedimentos de áreas úmidas, coletadas na Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS, vem demonstrando a capacidade de inibir diferentes micro-organismos. Dentre estas, um isolado bacteriano apresenta potencial atividade antimicrobiana contra espécies de *Listeria*. Assim, o objetivo desta pesquisa foi identificar e verificar o potencial antimicrobiano de uma bactéria previamente isolada deste sedimento de áreas úmidas. A pesquisa também compreendeu a purificação parcial e caracterização do composto antimicrobiano produzido por esta bactéria. O isolado foi identificado como *Bacillus* sp. sed 1.4 e a substância antimicrobiana produzida foi parcialmente purificada através da precipitação com sulfato de amônio, cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-200) e membrana de ultrafiltração. Posteriormente, a caracterização foi realizada quanto à sua estabilidade frente a diferentes temperaturas, proteases, solventes orgânicos e detergentes. A massa molecular do peptídeo foi estimada com cerca de 148 kDa por eletroforese desnaturante em gel de poliácridamida. A purificação resultou em uma atividade específica de 769,23 UA/mg. Esta substância antimicrobiana apresentou estabilidade a temperaturas elevadas e quando congelada a -20 °C, foi efetiva frente a espécies de *Listeria*, porém não teve potencial de inibição frente a outros isolados clínicos e de origem alimentar. O espectro de ação apresentado pela substância antimicrobiana parcialmente purificada, se aproxima ao espectro de ação apresentado por bacteriocinas de Classe IIa produzidas por espécies de *Bacillus*, característica que pode ser explorada pela indústria de alimentos.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., Peptídeos bioativos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (78 p.) Março, 2019.

CHARACTERIZATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY PRODUCED BY *Bacillus* sp. ISOLATED SOIL AREAS SEDIMENT ¹

Author: Luciani Cavalini
Advisor: Prof. Dr^a Amanda de Souza da Motta
Co-Advisor: Prof. Dr^a Ana Paula Folmer Corrêa

ABSTRACT

Antimicrobial peptides derived from *Bacillus* sp. have potential for inhibition against several pathogens, making them a promising starting point in the search for new antimicrobial substances. These compounds have been used in many areas, such as food quality and safety, and human health. Bacteria isolated from wetland sediment samples collected at the Conservation Unit (UC) of the Municipal Natural Park Imperatriz Leopoldina, located in the São Leopoldo City/RS, have demonstrated the ability to inhibit different microorganisms. Among these, a bacterial isolate has potential antimicrobial activity against *Listeria* species. Thus, the aim of this research was to identify and verify the antimicrobial potential of a bacterium previously isolated from this sediment of humid areas. The research also included the partial purification and characterization of the antimicrobial compound produced by this bacterium. The isolate was identified as *Bacillus* sp. sed 1.4 and the antimicrobial substance produced was partially purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration liquid chromatography (Sephadex G-200) and ultrafiltration membrane. Subsequently, the characterization was performed for its stability against different temperatures, proteases, organic solvents and detergents. The molecular mass of the peptide was estimated to be about 148 kDa by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Purification resulted in a specific activity of 769,23 AU / mg. This antimicrobial substance showed stability at high temperatures and when frozen at -20 °C, it was effective against *Listeria* species, but had no inhibition potential against other clinical isolates and food source. The action spectrum presented by the partially purified antimicrobial substance is close to the action spectrum presented by Class IIa bacteriocins produced by *Bacillus* species, a characteristic that can be exploited by the food industry.

Keywords: Antimicrobial activity, *Bacillus* sp., *Listeria* sp., bioactive peptides.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (78 p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Micro-organismos de importância clínica	4
3.2 Micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos	6
3.3 Importância da pesquisa por moléculas com potencial antimicrobiano	9
3.4 Ambientes naturais como fonte de micro-organismos produtores de antimicrobiano	11
3.5 Substâncias antimicrobianas produzidas por espécies de <i>Bacillus</i>	12
3.6 Perspectivas para aplicação de peptídeos bioativos na área clínica e de alimentos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Culturas bacterianas	19
4.1.1 Isolado bacteriano	19
4.1.1.1 Identificação do isolado bacteriano por espectrometria de massas	20
4.1.1.1.2 Construção do dendrograma	20
4.1.1.2 Identificação do isolado bacteriano via sequenciamento do gene 16S rRNA	21
4.1.2 Micro-organismos indicadores	21
4.2 Curva de crescimento e produção da substância antimicrobiana pelo isolado bacteriano	23
4.3 Purificação parcial do sobrenadante bruto da bactéria	24
4.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio	24
4.3.2 Cromatografia líquida de gel filtração	25
4.3.3 Membrana de Ultrafiltração	25
4.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis	25
4.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
4.6 Determinação do espectro de ação	27
4.7 Caracterização do sobrenadante bruto parcialmente purificado	27
4.7.1 Estabilidade térmica	27
4.7.2 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	28
4.7.3 Estabilidade frente a solventes orgânicos e detergentes	28
4.8 Análise estatística	28

5. RESULTADOS	29
5.1 Identificação do micro-organismo produtor.....	29
5.1.1 Identificação do micro-organismo produtor via MALDI-TOF/MS	29
5.1.1.1 Análise do dendrograma	29
5.1.2 Identificação do micro-organismo produtor via sequenciamento do gene 16S rRNA	30
5.2 Curva de crescimento do <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4 e produção da substância antimicrobiana.....	31
5.3 Purificação parcial da substância antimicrobiana produzida por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	32
5.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio	32
5.3.2 Cromatografia líquida de gel filtração (Sephadex G-200).....	33
5.3.3 Membrana de ultrafiltração.....	34
5.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis	34
5.5 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
5.6 Caracterização da substância antimicrobiana parcialmente purificada produzida por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	36
5.6.1 Estabilidade térmica da substância antimicrobiana.....	36
5.6.2 Estabilidade da substância antimicrobiana frente a enzimas proteolíticas....	36
5.6.3 Estabilidade da substância antimicrobiana frente a solventes orgânicos e detergentes.....	37
5.7 Espectro de ação da substância antimicrobiana parcialmente purificada contra isolados provenientes de amostras clínicas e de alimentos.....	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos indicadores para avaliação da atividade antimicrobiana	22
Tabela 2 – Concentração de proteínas solúveis das frações resultantes das etapas de purificação produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	35
Tabela 3 – Atividade residual da substância antimicrobiana do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4 após tratamento térmico	36
Tabela 4 – Efeito de substâncias químicas na atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto parcialmente purificado produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4	37
Tabela 5 – Espectro de ação da substância antimicrobiana parcialmente purificada de acordo com o halo de inibição (mm)	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da Unidade de Conservação (UC) do Parque Natural Municipal Imperatriz Leopoldina, localizada no município de São Leopoldo/RS	20
Figura 2 - Projeção da curva-padrão de albumina sérica bovina para determinação da concentração de proteínas solúveis	26
Figura 3 - Dendrograma das espécies de <i>Bacillus</i> demonstrando os níveis de similaridade da expressão fenotípica das proteínas presentes nos isolados	30
Figura 4 - Árvore filogenética obtida a partir do gene rRNA 16S das sequências com melhor similaridade sugeridas no BLAST e isolados identificados de outros sedimentos estudados	31
Figura 5 - Curva de crescimento do isolado <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4. O crescimento (•) e atividade antibacteriana (■) foram monitorados durante o crescimento em TSB a 30 °C. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. A cepa indicadora foi <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644. As barras de erro representam o desvio padrão (n=3)	32
Figura 6 - Atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto de <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4, nas diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio avaliado frente a cepa <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	33
Figura 7 - Perfil de eluição do sobrenadante bruto produzido por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4 precipitado (0-60%) em coluna de gel filtração Sephadex G-200. A absorbância (•) e a atividade antimicrobiana (■) foram determinadas para cada fração coletada.....	34
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata apresentando as bandas de proteínas das etapas de purificação parcial da substância antimicrobiana produzida por <i>Bacillus</i> sp. sed 1.4. A: G-200, B: precipitado na faixa de 0-60%, C: sobrenadante bruto, M: marcador molecular	35

8. REFERÊNCIAS

- Aires de Souza M. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clin Microbiol Infect.* 23(6):373-380.
- Alarcón-Lavín MP, Oyarzo C, Escudero C, Cerda-Leal F, Valenzuela F J. 2017. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. *Rev Med Chile.* 145: 1559-1564.
- Alcantara M, Morais ICL, Mattos C, Souza OCC. 2012. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. *Rev Br de Hig e Sanid Animal.* 6:1.
- Alkasaby NM, El Sayed Zaki M. 2017. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- β -Lactamases and Extended-Spectrum- β -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. *Int J Microbiol.* 2017: 3925868.
- Anandharaj M, Sivasankari B, Siddharthan N, Rani RP, Sivakumar S. 2016. Production, purification, and biochemical characterization of thermostable metalloprotease from novel *Bacillus alkalicellus* TWI3 isolated from tannery waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 178: 1666–1686.
- Arslan S, Eyi A, Özdemir F. 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *J Dairy Sci.* 94(12):5851-6
- Aunpad R, Na-Bangchang K. 2007. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol.* 55(4):308-13.
- Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. 2016. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56(5): 817-34.
- Baltz RH. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. 2016. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 43: 343–370.
- Bédard F, Biron E. 2018. Recent Progress in the Chemical Synthesis of Class II and S-Glycosylated Bacteriocins. *Front Microbiol.* 9:1048.
- Beltran JA, Aguilera-Mendoza L, Brizuela CA. 2018. Optimal selection of molecular descriptors for antimicrobial peptides classification: an evolutionary feature weighting approach. *BMC Genomics.* 19 (7):672.
- Bernat P, Paraszkiwicz K, Siewiera P, Moryl M, Płaza G, Chojniak J. 2016. Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 32:157.
- Bhandari V, Ahmod NZ, Shah HN, Gupta RS. 2013. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular

terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. Int J Syst Evol Microbiol. 63(7):2712-26

Boottanun P, Potisap C, Hurdle JG, Sermswan RW. 2017. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. AMB Express. 7(1):16.

Brandelli A, Daroit DJ, Correa APF. 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. Food Res Int. 73:149-161.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Acesso em 02 dez. 2018.

Brito BG, Tagliari KC, Pinheiro AR, Gomes LM, Berbel MM. 2006. Efeito da utilização de cal no controle de *Salmonella* e *Escherichia coli* em cama de criações de frango de corte. Suplemento Revista Brasileira de Ciência Avícola. 8:246.

Brown ED. 2006. Microbiology: antibiotic stops 'ping-pong' match. Nature. 441 (7091):293-4.

Broz P, Ohlson MB, Monack DM. 2012. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. Gut Microbes. 3(2):62-70.

Cebrián R, Arévalo S, Rubiño S, Arias-Santiago S, Rojo M, Montalban-Lopez M, Martínez-Bueno M, Valdivia E, Maqueda M. 2018. Control of *Propionibacterium acnes* by natural antimicrobial substances: Role of the bacteriocin AS-48 and lysozyme. Sci Rep. 8:11766.

Chalasanani AG, Dhanarajan G, Nema S, Sen R, Roy U. 2015. An Antimicrobial Metabolite from *Bacillus* sp.: Significant Activity against Pathogenic Bacteria Including Multidrug-Resistant Clinical Strains. Front Microbiol. 6:1335.

Chambers HF, Basuino L, Hamilton SM, Choo EJ, Moise P. 2016. Daptomycin- β -Lactam Combinations in a Rabbit Model of Daptomycin-Nonsusceptible Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 60(7):3976-9.

Chater KF. Recent advances in understanding *Streptomyces*. 2016. F1000 Research. 5: 2795.

Chen Y, Liu SA, Mou H, Ma Y, Li M, Hu X. 2017. Characterization of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from Marine Sediments. Front Microbiol. 8:871.

Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IHM, Labbé Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter

F, Luchters SMF, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm.* 1-10.

Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol.* 38 (4):251-6.

Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens.* 6:41.

Conti R, Guimarães DO, Pupo MT. 2012. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Cienc. Cult.* 64:43-47.

Demain AL. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41(2):185-201.

Dimkić I, Stanković S, Nišavić M, Petković M, Ristivojević P, Fira D, Berić T. 2017. The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains. *Front Microbiol,* 8:925.

Drew CA, Clydesdale FM. 2015. New food safety law: effectiveness on the ground. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 55(5):689-700

Duarte C, Gudiña EJ, Lima CF, Rodrigues LR. 2014. Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. *AMB Express.* 4: 40.

Ebrahimipour GH, Khosravibabadi Z, Sadeghi H, Aliahmadi A. 2014. Isolation, Partial Purification and Characterization of an Antimicrobial Compound, Produced by *Bacillus atrophaeus*. *Jundishapur J Microbiol.* 7: e11802.

Elbanna K, Elnaggar S, Bakeer A. 2014. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. *J Phytopathol.* 162: 712–722.

El-Shouny WA, Ali SS, Sun J, Samy SM, Ali A. 2018. Drug resistance profile and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESβL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. Essential oils and their potential for utilization. *Microb Pathog.* 116: 301-312.

Ercoli L, Gallina S, Nia Y, Auvray F, Primavilla S, Guidi F, Pierucci B, Graziotti C, Decastelli L, Scuota S. 2017. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak from a Chantilly Cream Dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathog Dis.* 14 (7):407-413.

Farag AM, Abd-Elnabey HM, Ibrahim H A H, El-Shenawy M. 2016. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*, Egypt *J Aquat Res.* 42: 185-192.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld A. 2007. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.* XII, Mosby Elsevier, St Louis, Missouri.

Franco BDGM, Landgraf M. 2005. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 182 p.

García-Cobos S, Kock R, Mellmann A, Frenzel J, Friedrich AW, Rossen JWA. 2015. Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. PLoS One. 10 (7): e0134533.

Garcia-Gutierrez E, Mayer M J, Cotter P D, Narbad A. 2019. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. Gut Microbes. 10: 1-21.

Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, Kumar A, Kapila S. 2014. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. Probiotics Antimicrob Proteins. 6(1): 47-58.

Gogoi M, Shreenivas MM, Chakravorty D. 2018. Hoodwinking the Big-Eater to Prosper: The *Salmonella*-Macrophage Paradigm. J Innate Immun. 1-11

Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 73: 3272-3282

Gonzalez GDT, Sigrist R, Paulo BS. 2016. Avanços recentes na manipulação de genes para uma produção de peptídeos não ribossomais. RVq. 8: 1998-2025.

Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP, Fox EM. 2018. Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. Front Microbiol. 9: 605.

Guo Y, Zhanqiao Y, Jianhua X, Rijun Z. 2012. Identification of a New *Bacillus licheniformis* Strain Producing a Bacteriocin-Like Substance. Int J Microbiol. 50: 452-458.

Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJ. 2016. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones?. Front Microbiol. 7: 788.

Guzmán-Trampe S, Ceapa CD, Manzo-Ruiz M, Sánchez S. 2017. Synthetic biology era: Improving antibiotic's world. Biochem Pharmacol. 134: 99-113

Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, de Silva NR, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleeschauwer B. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. PLoS Med. 12: e1001923.

Heini N, Stephan R, Ehling-Schulz M, Johler S. 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. Int J Food Microbiol. 283: 59-64

Helal HS, Hanora A, Khattab RA, Hamouda H, Zedan H. 2018. Mining of Egypt's Red Sea invertebrates for potential bioactive producers. Biotechnol Lett. 40:1519-1530.

Heukeshoven J, Dernick R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Wiley – VCH. 6:103-112.

Hmidet N, Ben Ayed H, Jacques P, Nasri M. 2017. Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. Biomed Res Int. 5893123.

Hover BM, Kim SH, Katz M, Charlop-Powers Z, Owen J, Ternei M, Maniko J, B. Estrela A, Molina H, Park, Perlin D, F. Brady S. 2018. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. Nat Microbiol. 3(4):415-422.

Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. 2015. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. Clin Microbiol Rev. 28 (3):687-720.

Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Res Int. 2014:827965.

Khochamit N, Siripornadulsil S, Sukon P, Siripornadulsil W. 2015. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiol. Res. 170: 36-50.

Ki JS, Zhang W, Qian PY. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. J Microbiol Methods. 77(1):48-57.

Kim MC, Min-Hyeok C, Jae-Gee R, Gun-Lo W. 2017. Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Fresh Produces and Human Fecal Samples. Foodborne Pathog Dis. 14: 4.

Kleerebezem M, Quadri LE. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. Peptides. 22(10):1579-96.

Koblitz MGB, Pastore GM. 2004. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24(2): 287-292.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680–685.

Le Lay C, Dridi L, Bergeron MG, Ouellette M, Fliss IL. 2016. Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. J Med Microbiol. 65(2):169-75.

Lee MH, Lee J, Nam YD, Lee JS, Seo MJ, Yi SH. 2016. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food. Int J Food Microbiol. 221:12-8.

- Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. 2017. Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* Producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the Same Animal. *Antimicrob Agents Chemother.* 61 2:e01444-16.
- Liu Z, Wang Y, Walsh TR, Liu D, Shen Z, Zhang R, Yin W, Yao H, Li J, Shen J. Plasmid-Mediated Novel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017. 61: 5.
- Liu S, Bao J, Lao X, Zheng H. 2018. Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Sci Rep.* 8: 11189.
- Liu X, Lee JY, Jeong SJ, Cho KM, Kim GM, Shin JH, Kim JS, Kim JH. 2015. Properties of a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* EMD4 Isolated from Ganjang (Soy Sauce). *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (9): 1493–1501.
- Logan LK, Weinstein RA. 2017. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 215: 28-36.
- Lopes R, Cerdeira L, Tavares GS, Ruiz JC, Blom J, Horácio ECA, Mantovani HC, Queiroz MV. 2017. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol.* 33: 185.
- Losso JN. 2008. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(1): 94-118.
- Loureiro RJ, Roque F, Rodrigues AT, Herdeiro MT, Ramalheira E. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Port J Public Health.* 34: 77-84
- Lupo A, Vogt D, Seiffert SN, Endimiani A, Perreten V. 2014. Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *J Food Prot.* 77(11):1976-81.
- Maffioli SI, Zhang Y, Degen D, Carzaniga T, Del Gatto G, Serina S, Monciardini P, Mazzetti C, Guglielame P, Candiani G, Chiriac AI, Facchetti G, Kaltofen P, Sahl HG, Dehò G, Donadio S, Ebright RH. 2017. Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA polymerase. *Cell.* 169: 1240-1248.e23.
- Mahajan GB, Balachandran L. 2017. Sources of antibiotics: Hot springs. *Biochem Pharmacol.* 134:35-41.
- Manrique Y, Gibis M, Schmidt H, Weiss J. 2016. Antimicrobial efficacy of sequentially applied eugenol against food spoilage micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 121(6):1699-1709
- Martín-Aspas A, Guerrero-Sánchez FM, García-Colchero F, Rodríguez-Roca S, Girón-González JA. 2018. Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infect Drug Resist.* 11:861-872.

Martínez B, García P, Rodríguez A. 2018. Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 56:1-6.

Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2017. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol.* 8: 1205.

Miles AA, Misra SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Int J Hyg Environ Health.* 38(6):732-749

Moellering RC. 2011. Discovering new antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents.* 37(1): 2-9.

Mohamad LO, Ma JB, Hatab S, Xu La Guo J, Rasulov BA, Liu YH, Hedlund BP, Li WJ. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Front Microbiol* 9: 924.

Mohan V, Sen P. 2018. Elucidation of active site dynamics of papain and the effect of encapsulation within cationic and anionic reverse micelles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 200: 202-211

Motta AS & Brandelli A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol Biochem.* 92:63-71

Motta AS, Cannavan FS, Tsai S-M, Brandelli A. 2007. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch Microbiol.* 188(4):367–375

Motta AS, Lorenzini DM, Brandelli A. 2007. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. *Curr Microbiol.* 54(4):282-6.

Moura GS, Gebreyes WA, Marques MFS, Stipp DT, Souza FN, Da Costa LB, Oliveira CJB. 2018. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. *J Dairy Sci.* 101(9):7804-7807.

Nithya V, Prakash M, Halami PM. 2018. Utilization of Industrial Waste for the Production of Bio-Preservative from *Bacillus licheniformis* Me1 and Its Application in Milk and Milk-Based Food Products. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 10(2):228-235.

Nunes DM, Júnior FJP, Melo JS, De-Oliveira EC, Meneguini VC, Dias F, Weissheimer FL, Dimech GS. 2016. Outbreak of foodborne disease at a mass event of indigenous peoples in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil, in 2013. *Epidemiol Serv Saude.* 25(1):195-202.

Oliveira MEF, Araújo DG, Oliveira SR. 2017. Resistência de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados de hemoculturas de um hospital de emergência. *J Bras Patol Med.* 53(2):87-91.

Owusu-Kwarteng J, Wuni A, Akabanda F, Tano-Debrah K, Jespersen L. 2017. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. BMC Microbiol. 17: 65.

Padoveze MC, Fortaleza CMCB. 2014. Infecções associadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. Rev. Saúde Pública São Paulo. 48(6):995-1001.

Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Pavão SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. 2013. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. J Antimicrob Chemother. 69 (3): 598-602.

Petchiappan A, Chatterji D. 2017. Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega. 2(10):7400-7409.

Quintero M, Velásquez A, Jutinico LM, Jiménez-Vergara E, Blandón LM, Martinez K, Lee HS, Gómez-León J. 2018. Bioprospecting from marine coastal sediments of Colombian Caribbean: screening and study of antimicrobial activity. J Appl Microbiol. 125(3):753-765.

Ramsamy Y, Essack SY, Sartorius B, Patel M, Mlisana KP. 2018. Antibiotic resistance trends of ESKAPE pathogens in Kwazulu-Natal, South Africa: A five-year retrospective analysis. Afr J Lab Med. 7: 887.

Regmi S, Choi YS, Choi YH, Kim YK, Cho SS, Yoo JC, Suh JW. 2017. Antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* CSB138: characterization, killing kinetics, and synergistic potency. Int Microbiol. 20(1):43-53.

Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 197: 1079–1081.

Roschanski N, Fischer J, Falgenhauer L, Pietsch M, Guenther S, Kreienbrock L, Chakraborty T, Pfeifer Y, Guerra B, Roesler UH. 2018. Retrospective Analysis of Bacterial Cultures Sampled in German Chicken-Fattening Farms during the Years 2011-2012 Revealed Additional VIM-1 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and a Serologically Rough *Salmonella enterica* Serovar Infantis. Front Microbiol. 9:538.

Rosner BM, Schielke A, Didelot X, Kops F, Breidenbach J, Willrich N, Götz G, Alter T, Stingl K, Josenhans C, Suerbaum S, Stark K. 2017. A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011-2014. Sci Rep. 7: 5139.

Ryall B, Carrara M, Zlosnik JE, Behrends V, Lee X, Wong Z, Loughheed KE, Williams HD. 2014. The mucoid switch in *Pseudomonas aeruginosa* represses quorum sensing systems and leads to complex changes to stationary phase virulence factor regulation PLoS One. 9: e96166.

Salazar F, Ortiz A, Sansinenea E. 2017. Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. J of Global Antimicrob Resist. 11: 177-182

Santos IAL, Nogueira JMR, Mendonça FCR. 2015. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. RBAC. 47: 5-12.

Saraoui T, Fall PA, Leroi F, Antignac J-P, Chéreau S, Pilet MF. 2016. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Food microbil. 53: 70-78.

Seal BS, Drider D, Oakley BB, Brüssow H, Bikard D, Rich JO, Miller S, Devillard E, Kwan J, Bertin G, Reeves S, Swift SM, Raicek M, Gay CG. 2018. Microbial-derived products as potential new antimicrobials. Vet Res. 49(1):66.

SEMMAM – Secretaria Municipal de Meio Ambiente. Atlas Socioambiental de São Leopoldo. Rio Grande do Sul, 2012.

Shah AM, Shakeel-U-Rehman, Hussain A, Mushtaq S, Rather MA, Shah A, Ahmad Z, Khan IA, Bhat KA, Hassan QP. 2017. Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas, India. Microb Pathog. 110: 93-99

Sharma N, Gupta A, Gautam N. 2014. Characterization of Bacteriocin like inhibitory substance produced by a new Strain *Brevibacillus borstelensis* AG1 Isolated from 'Marcha'. Braz J Microbiol. 45(3):1007-15

Sharma V, Ayothiraman S, Dhakshinamoorthy V. 2018. Production of highly thermo-tolerant laccase from novel thermophilic bacterium *Bacillus* sp. PC-3 and its application in functionalization of chitosan film. J Biosci Bioeng. 127: 672-678.

Shu LJ, Yang YL. 2017. Bacillus Classification Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry-Effects of Culture. Sci. 7:15546.

SILVA LN, Da Hora GCA, Soares TA, Bojer MS, Ingmero H, Macedo AJ, Trentina DS. 2017. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. Scientific Reports. 7: 2823.

Silver LL. 2017. The Antibiotic Future: Topics in Medicinal Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg.

Son S, Ko S-K, Jang M, Kim JW, Kim GS, Lee JK, Jeon ES, Futamura Y, Ryoo I-J, Lee JS, Oh H, Hong Y-S, Kim BY, Takahashi S, Osada H, Jang JH, Ahn JS. 2016. New Cyclic Lipopeptides of the Iturin Class Produced by Saltern-Derived *Bacillus* sp. KCB14S006. Mar Drugs. 14(4): 72.

Sosio M, Gaspari E, Iorio M, Pessina S, Medema MH, Bernasconi A, Simone M, Maffioli SI, Ebricht RH, Donadio S. 2018. Analysis of the Pseudouridimycin

Biosynthetic Pathway Provides Insights into the Formation of C-nucleoside Antibiotics. *Cell Chem Biol.* 25(5): 540-549.

Starostin KV, Demidov EA, Bryanskaya AV, Efimov VM, Rozanov AS, Peltek SE. 2015. Identification of *Bacillus* strains by Maldi ToF Ms using geometric approach. *Scientific Reports.* 5:16989

Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahm YT. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 61(2):93–103

Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, Visessangua W. 2010. *Bacillus siamensis* sp. Nov., isolated from salted crab (pookhem) in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(10): 2364-70

Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 34(5):3-10.

Valdés-Stauber N, Scherer S. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.*60 (10):3809-14.

Van der Kolk JH, Endimiani A, Graubner C, Gerber V, Perreten V. 2018. *Acinetobacter* in Veterinary Medicine with emphasis on *A. baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist.* 16:59-71.

Wajid M, Awan AB, Saleemi MK, Weinreich J, Schierack P, Sarwar Y, Ali A. 2018. Multiple Drug Resistance and Virulence Profiling of *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium* and *Enteritidis* from Poultry Farms of Faisalabad, Pakistan. *Microb Drug Resist.* 25(1):133-142

Walsh C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.*1 (1):65-70.

Yan H, Yun J, Ai D, Zhang W, Bai J, Guo J. 2018. Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 and their inhibitory activity against *Trichothecium roseum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 34: 21.

Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 5: 241.

Ye, R, XU C, Wan S, Peng L, Wang H, Xu ZP, Aguilar Y, Xiong Z, Zeng HW. 2013. Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine. *Biochem Biophys Res. Commun* 439: 148-153

Zhao P, Xue Y, Gao W, Li J, Zu X, Fu D, Bai X, Zuo Y, Hu Z, Zhang F. 2018. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides.* 101: 10-16

Zhou Z, Meng H, Liu Y, Gu JD, Li M. 2017. Stratified Bacterial and Archaeal Community in Mangrove and Intertidal Wetland Mudflats Revealed by High Throughput 16S rRNA Gene Sequencing. *Front Microbiol.*8:2148.

Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang J, Huang G. 2018. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 117: 781-789