

SARAH MEDEROS DA SILVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
ANTIMICROBIANAS EM ISOLADOS
PSICROTOLERANTES E TERMOTOLERANTES
DA REGIÃO ANTÁRTICA**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2018**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Selma Soares de Oliveira e coorientação de Sheila da Silva.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mederos, Sarah Silveira

Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em isolados psicrotolerantes e termotolerantes da região Antártica / Sarah Mederos da Silveira. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.

xvii; 72f. : il ; 30cm

Orientador: Selma Soares de Oliveira

Coorientador: Sheila da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2018.

Bibliografia: f. (61-69)

1. Psicrotolerantes 2. Termotolerantes 3. Substâncias antimicrobianas 4. Bioprospecção

I. Oliveira, Selma Soares II. Silva, Sheila III. UFRJ. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. IV. Título

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Sarah Mederos da Silveira

DRE: 115053352

BANCA EXAMINADORA: Profa. Marinella Laport Silva (Presidente)
 Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira
 Prof. Matheus Godoy
 Profa. Renata Cristina Picão (Suplente)

Título da Monografia: "Bioprospecção de substâncias antimicrobianas em isolados psicrotolerantes e termotolerantes da região Antártica"

Local: Sala de reuniões do Departamento de Microbiologia Geral / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 5 de dezembro de 2018 às 11:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 5 de dezembro de 2018.

NOTA


10


10.0

10.0

Banca Examinadora:


 Profa. Marinella Laport Silva


 Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira


 Prof. Matheus Godoy

 Profa. Renata Cristina Picão

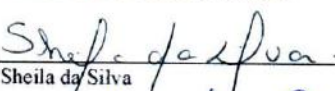
Aluno:

SARAH MEDEROS DA SILVEIRA
 Sarah Mederos da Silveira

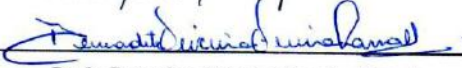
Orientador:


 Profa. Selma Soares de Oliveira

Coorientador:


 Sheila da Silva

**Coordenador
 de TCC**


 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus irmãos:
Rebecca, Miguel, Daniela e Adriano Tito.
Espero que eu seja um bom exemplo para todos vocês.
Sem vocês, nada disso faria sentido. Obrigada!

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente ao ensino público, que me proporcionou a oportunidade de cursar o Ensino Médio e o Ensino Superior em Instituições Federais. Espero que a educação pública de qualidade permaneça sempre acessível aos mais necessitados. Para sempre o Colégio Pedro II marcou minha formação como ser humano e como jovem cientista na UFRJ, não existem palavras para agradecer por isso.

Agradeço imensamente à equipe do meu laboratório, principalmente à minha orientadora Selma e à minha coorientadora Sheila, por me instruírem, aguentarem o fato de eu ser ligada em 220V e, principalmente, por terem me proporcionado a experiência maravilhosa de fazer parte do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM) / Laboratório de Genética de Microrganismos Associados a Alimentos e a Indústria (LGMAI). Pude desenvolver um projeto maravilhoso ao lado delas e dos meus colegas Felipe e João Ricardo. Também não posso esquecer de Renato, o melhor e mais bem-humorado técnico do Instituto de Microbiologia, junto com meus colegas de turma Julianna Camile, Roberto e Thiago, que me acompanharam em muitas idas ao bandeirão, provas e comilanças. Obrigada pela ajuda e pela companhia, em momentos dentro e fora do laboratório, dos colegas do LEMM e LCPM, que me ajudaram na pesquisa e contribuíram para meu crescimento como pessoa e pesquisadora. Em particular, agradeço a Alexandre e Júnia por me cederem as amostras deste trabalho, e a Bernadete por ter sido minha tutora. Espero ter sido motivo de orgulho para vocês.

Além dos amigos que fiz na UFRJ, quero agradecer imensamente à minha família, principalmente aos meus irmãos, a quem eu dedico esse trabalho, e à minha falecida vovó Vera, que se formou na mesma instituição de ensino que eu, mas que lamentavelmente não viveu a tempo de ver eu me formar; espero que você esteja orgulhosa de mim onde quer que esteja. Obrigada a minha mamãe Alessandra Karina e, principalmente, obrigada a meu papai Tito Fernando, por ter me guiado até aqui e ter me ajudado desde sempre, sacrificando-se para que eu tivesse sempre a melhor formação. Sem você, papai, não estaria fazendo essa faculdade, muito obrigada por ter me feito entrar para o fascinante mundo da Microbiologia. Obrigada, Helô, pelos primeiros passos. Obrigada Ana Cláudia, a melhor madrastra que alguém poderia ter, por sempre me ajudar. Obrigada avós e avôs, principalmente meu vovô Beto, que sempre me acolheu, tanto emocionalmente, quanto fisicamente; espero que você esteja orgulhoso de mim.

Por último, agradeço ao meu melhor amigo e meu namorado Guilherme Henrique, que me acompanhou desde o 2º período da faculdade e sempre me deixou imensamente feliz. Te amo; espero continuar ao seu lado, aprendendo muito e amadurecendo muito também; obrigada por me aturar todos esses anos, sem você eu estaria perdida. Obrigada imensamente também por me proteger dos meus medos e me ajudar a superá-los, continue sendo essa pessoa maravilhosa pela qual eu me apaixonei.

Espero que eu seja motivo de orgulho para todos vocês!

Até mais, e obrigada pelos peixes!

“Na Universidade se ensina porque se pesquisa.”

Carlos Chagas Filho

RESUMO

SARAH MEDEROS DA SILVEIRA

BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS EM ISOLADOS PSICROTOLERANTES E TERMOTOLERANTES DA REGIÃO ANTÁRTICA

Orientadora: Selma Soares de Oliveira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A região Antártica apresenta um ecossistema adaptado a condições de baixas temperaturas. Enzimas e proteínas produzidas por microrganismos extremófilos possuem maior flexibilidade e, conseqüentemente, maior atividade em temperaturas extremas. Produtos deste grupo de bactérias têm despertado bastante interesse em pesquisas de bioprospecção pelo potencial biotecnológico que apresentam. O objetivo deste trabalho é verificar a produção de substâncias antimicrobianas em estirpes isoladas da Antártica, realizando testes de antagonismos entre estirpes bacterianas extremófilas para verificar a inibição de microrganismos de interesse clínico com resistência a diversos antimicrobianos. Para isso, foram estudados dois grupos de microrganismos extremófilos: os microrganismos psicrotolerantes e os termotolerantes. Foram selecionadas 88 bactérias psicrotolerantes de diferentes gêneros, sendo 54 amostras de *Pseudomonas* spp., já que estirpes do gênero *Pseudomonas* têm sido descritas na literatura como bactérias produtoras de bacteriocinas. Já para o grupo dos microrganismos termotolerantes, foram selecionados 24 microrganismos dos gêneros *Geobacillus*, *Anoxybacillus* e *Brevibacillus*. Para testar a atividade antimicrobiana, utilizamos como bactérias indicadoras estirpes isoladas de infecções hospitalares e resistentes a antibióticos como a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus* sp.. As estirpes que apresentaram atividade antimicrobiana foram avaliadas quanto à natureza química por meio de tratamentos com NaOH 0,1N e protease 5 mg/mL. Os sobrenadantes destas amostras foram liofilizados para a determinação do espectro de ação e de caracterização química.

Os resultados mostram que dois isolados psicotolerantes e dois isolados termotolerantes produziram halo de inibição de 5 mm na presença de NaOH 0,1N e protease 5 mg/mL, possuindo atividade antimicrobiana contra estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus* sp..

Palavras-chave: Psicotolerantes, Termotolerantes, Substâncias Antimicrobianas, Bioprospecção

ABSTRACT

SARAH MEDEROS DA SILVEIRA

BIOPROSPECTION OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES IN ISOLATES PSYCHROTOLERANTS AND THERMOTOLERANTS OF THE ANTARCTIC REGION

Orientadora: Selma Soares de Oliveira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The Antarctic region presents an ecosystem adapted to conditions of low temperatures. Enzymes and proteins produced by extremophilic microorganisms have greater flexibility and, consequently, greater activity in extreme temperatures. Products of this group of bacteria have aroused a great deal of interest in bioprospecting research due to the biotechnological potential they present. The objective of this work is to verify the production of antimicrobial substances in strains isolated from Antarctica, performing antagonistic tests between extremophilic bacterial strains to verify the inhibition of microorganisms of clinical interest with resistance to various antimicrobials. In order to do so, two groups of extremophilic microorganisms were studied: the psychrotolerant microorganisms and the thermotolerant microorganisms. 54 samples of *Pseudomonas* spp. were used, since strains of the genera *Pseudomonas* have been described in the literature as bacteria producing bacteriocins. For the group of thermotolerant microorganisms, 24 microorganisms of the genus *Geobacillus*, *Anoxybacillus* and *Brevibacillus* were used. To test antimicrobial activity, as indicator bacteria strains isolated from hospital and antibiotic resistant infections were used such as *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* and *Micrococcus* sp.. The strains that presented antimicrobial activity were evaluated for chemical nature by treatments with NaOH 0,1N and protease 5 mg/mL. The supernatants of these samples were lyophilized for determination of the action spectrum and chemical characterization.

Results show that at two psychrotolerant isolates and two thermotolerant isolates produced a 5 mm inhibition halo in the presence of NaOH 0,1N and 5 mg/mL protease, possessing antimicrobial activity against strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Micrococcus* sp..

Key-words: Psychoterolerant, Thermotolerant, Antimicrobial Substances, Bioprospecting

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Classes de antibióticos sintéticos em uso clínico humano.	10
Figura 2 - Esquema representando os diversos mecanismos de ação de antibióticos.	13
Figura 3 - Aplicação das bacteriocinas em diferentes áreas.	16
Figura 4 - Estrutura primária da Nisina.	18
Figura 5 - Propostas de classificação das bacteriocinas que vem sendo apresentadas ao longo do tempo.	20
Figura 6 - Esquema mostrando o sistema de funcionamento de uma bacteriocina.	21
Figura 7 - Mapa do arquipélago de Shetland na Antártica.	33
Figura 8 - Imagem das construções que foram utilizadas na exploração baleeira em Whalers Bay e fumarolas emitindo gases em Fumarole Bay.	34
Figura 9 - Esquema do continente antártico.	35
Figura 10 - Foto do método com poços em placas.	38
Figura 11 - Foto detalhando o método com vapor de clorofórmio.	39
Figura 12 - Área de lise típica, utilizando diferentes bacteriófagos.	40
Figura 13 - Procedimento de liofilização.	44
Figura 14 - Resultado do teste de antagonismo das amostras termotolerantes utilizando o método de vapor de clorofórmio.	50
Figura 15 - Resultado do teste de antagonismo utilizando NaOH e protease.	52
Figura 16 - Resultado da extração de DNA no gel de agarose 1% (Tedia Brazil®).	53

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Classificação de microrganismos extremófilos.	2
Tabela 2 - Lista dos principais patógenos bacterianos encontrados em infecções hospitalares e as doenças que causam.	9
Tabela 3 - Lista dos principais antibióticos naturais utilizados na clínica médica humana e suas características.	12
Tabela 4 - Esquema de classificação original de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.	18
Tabela 5 - Características de algumas das principais espécies de <i>Pseudomonas</i> .	24
Tabela 6 - Lista das bactérias psicotolerantes de diferentes gêneros, isoladas da Ilha King George na região Antártica, que foram selecionadas para a realização dos testes de produção de substância antimicrobiana.	29
Tabela 7 - Lista das amostras de <i>Pseudomonas</i> spp. psicotolerantes, isoladas da Ilha King George na região Antártica, que foram selecionadas para a realização dos testes de produção de substância antimicrobiana.	31
Tabela 8 - Lista das bactérias termotolerantes, isoladas da Ilha Deception na região Antártica, que foram selecionadas para a realização dos testes de produção de substância antimicrobiana.	34
Tabela 9 - Espécies bacterianas usadas como indicadores no teste de antagonismo.	36
Tabela 10 - Lista dos detergentes utilizados nos testes.	42
Tabela 11 - Resultado do teste de antagonismo.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC – Do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*

EGM – Elementos Genéticos Móveis

ESBL – Do inglês, *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*

FDA – Do inglês, *Food and Drug Administration*

FFDCA – Do inglês, *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*

GRAS – Do inglês, *Substances Generally Recognized as Safe*

HPP – Do inglês, *High Pressure Processing*

KPC – *Klebsiella* produtora de carbapenemase

MRSA – Do inglês, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

NCBI – Do inglês, *National Center for Biotechnology Information*

SPM – *Pseudomonas* produtora de metallo- β -lactamase

THG – Transferência Horizontal de Genes

UTI – Unidade de terapia intensiva

UV – Radiação ultravioleta

VRE – Do inglês, *Vancomycin-Resistance Enterococcus*

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELA	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Antártica	1
1.2 Bactérias psicrotolerantes e termotolerantes	2
1.2.1 Principais características de bactérias psicrotolerantes e termotolerantes	2
1.2.2 Estudos e aplicações biotecnológicas de microrganismos extremófilos	5
1.3 Bactérias resistentes a antibióticos	7
1.3.1 História e impacto na sociedade	7
1.3.2 Classes de antibióticos e mecanismos de resistência	9
1.4 Peptídeos antimicrobianos	15
1.4.1 Classificação e características de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	15
1.4.2 Aplicações biotecnológicas de substâncias antimicrobianas na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica	22
1.5 Gênero <i>Pseudomonas</i>	24
1.5.1 Características do gênero	24
1.5.2 Substâncias antimicrobianas do gênero <i>Pseudomonas</i>	25
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Seleção das estirpes	28
4.1.1 Seleção das estirpes psicrotolerantes e termotolerantes	28
4.1.2 Seleção das estirpes bacterianas indicadoras	36
4.2 Teste de antagonismo para avaliar a atividade antimicrobiana	38
4.2.1 Teste de antagonismo com método de poços em placas de LB sólido	38
4.2.2 Teste de antagonismo com método com vapor de clorofórmio	39
4.2.3 Indução de bactéria lisogênica por UV	40
4.3 Isolamento e concentração das substâncias antimicrobianas	41
4.3.1 Método com centrifugação e aplicação do sobrenadante	41
4.3.2 Método de lise celular por ação de detergentes	41
4.3.3 Método de lise celular por FastPrep	43
4.3.4 Método de concentração e obtenção do extrato bruto por Speed Vac	43
4.3.5 Método de concentração por liofilização	44
4.3.6 Adição de NaOH e protease para verificar a natureza química das substâncias antimicrobianas	45
4.4 Caracterização inicial da produção das substâncias antimicrobianas	46
4.4.1 Ação do tempo de crescimento sobre a atividade antimicrobiana	46
4.4.2 Ação da mudança de pH do meio sobre a atividade antimicrobiana	46
4.5 Extração de DNA para sequenciamento das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas	47

4.5.1	Método rápido de extração de DNA cromossômico	47
4.5.2	Eletroforese	48
4.5.3	Quantificação de DNA	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Teste de antagonismo para verificar a produção de substâncias antimicrobianas	49
5.2	Indução de bactéria lisogênica por UV	50
5.3	Isolamento e concentração das substâncias antimicrobianas	50
5.3.1	Método de centrifugação e aplicação do sobrenadante	50
5.3.2	Método de concentração do extrato bruto por Speed Vac	50
5.3.3	Método de concentração por liofilização	51
5.3.4	Método de lise celular por ação de detergentes	51
5.3.5	Método de lise celular por FastPrep	51
5.3.6	Adição de NaOH e protease para verificar a natureza química das substâncias antimicrobianas	51
5.4	Caracterização inicial da produção das substâncias antimicrobianas	52
5.4	Extração de DNA	53
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antártica

A Antártica é composta pelo continente Antártico e pelas ilhas adjacentes, totalizando 13,6 milhões de quilômetros quadrados. Essa região polar desempenha um papel essencial na manutenção e na regulação do clima no planeta (Turner *et al.*, 2009a), devido à presença de temperaturas baixas, sendo conhecido como o continente mais frio e com a menor temperatura registrada na terra: -89.28°C na estação Vostok da Rússia (Turner *et al.*, 2009b). Esse ecossistema severo possui condições abióticas extremas, como temperaturas que variam em média de 15°C até -50°C , além da baixa disponibilidade de nutrientes e altas taxas de radiação. O estresse térmico, de umidade e de extensa exposição UV é desafiador para a manutenção da vida, fazendo com que o componente biótico desse ecossistema seja quase exclusivamente microbiano (Cowan e Tow, 2004). Esses microrganismos, chamados de extremófilos, tiveram que se adaptar para sobreviver neste ambiente. A competição microbiana entre microrganismos e suas diferentes taxas de crescimento, colonização e aquisição de nutrientes pode desempenhar um papel importante na regulação dos processos biogeoquímicos que estão ligados às comunidades microbianas nos solos polares (Terrence *et al.*, 2013). O aquecimento do clima e a contaminação humana têm grande efeito na estrutura e função das comunidades microbianas presente nos solos polares, mudando a dinâmica competitiva entre as espécies. A aplicação industrial dessa competição entre espécies pode ser feita através de estudos envolvendo biorremediação ou na exploração de produtos bactericidas.

A Antártica tem 99,7% do solo coberto de gelo, sendo que os 0,3% do solo restante é sítio de diferentes atividades humanas. Essas áreas livres de gelo são indiscutivelmente as mais vulneráveis a mudanças antropogênicas como: a poluição do local com produtos derivados de petróleo, modificações na paisagem e perturbação da vida selvagem (Cowan, 2014). Dessa forma, a biodiversidade e a investigação de produtos com potencial biotecnológico em microrganismos extremófilos da Antártica são alvo de pesquisas, sejam elas para caracterizar novas linhagens bacterianas e seus produtos enzimáticos, ou para compreender os mecanismos de adaptação ao clima extremo, como a presença de uma membrana mais fluida e de proteínas anti-congelantes (Marx *et al.*, 2006).

1.2. Bactérias psicrotolerantes e termotolerantes

1.2.1. Principais características de bactérias psicrotolerantes e termotolerantes

A microbiologia da Antártica é bastante diversa devido às condições de temperatura e radiação ultravioleta extremas, mostrando que mesmo diante de todas as condições adversas do ambiente há a colonização por microrganismos extremófilos, que ao longo dos anos evoluíram para se adaptarem aos parâmetros físico-químicos mais rigorosos. Existem dois grupos de microrganismos extremófilos que estão relacionados diretamente com a temperatura do ambiente (Tabela 1): os microrganismos termotolerantes, que crescem em altas temperaturas, e os microrganismos psicrotolerantes, que crescem em baixas temperaturas (Zhang e Kim, 2010).

Os microrganismos termotolerantes são encontrados em fontes vulcânicas no ambiente antártico, enquanto os psicrotolerantes podem ser encontrados em geleiras e em gramíneas na Antártica. O termo extremófilo vem do sufixo -filo, que significa “que gosta de”. Nesse caso, os microrganismos se adaptaram para viver em condições extremas de temperatura. O metabolismo desses microrganismos é então adaptado para a sobrevivência em condições extremas do ambiente. Desta forma, quanto maior é a variedade de metabolismos distintos que encontramos no ambiente, maior é a flexibilidade destes metabolismos. Com isso, as chances de se encontrar uma enzima, gene ou composto com interesse biotecnológico são maiores.

Tabela 1 – Classificação de microrganismos extremófilos. Adaptado de Madgan *et al.* (2016).

Tipo de extremófilos	Termo descritivo	Principal gênero	Domínio	Habitat	Média
Temperatura alta	Termotolerantes	<i>Methanopyrus</i>	Archaea	Fontes hidrotermais	55°C até 106°C
Temperatura baixa	Psicrotolerantes	<i>Psychromonas</i>	Bacteria	Geleiras	5°C até -20°C
pH alto	Alcalifilo	<i>Natronobacterium</i>	Archaea	Lagos ricos em carbonato de sódio	10
pH baixo	Acidófilo	<i>Picrophilus</i>	Archaea	Fontes termais ácidas	0,7
Pressão	Piezófilo	<i>Moritella</i>	Bacteria	Sedimentos oceânicos	700 atm
Salinidade (NaCl)	Halófilo	<i>Halobacterium</i>	Archaea	Salinas	25%

A temperatura é um fator ambiental crítico para o controle da evolução e biodiversidade da vida na terra. A maior parte da biosfera na terra está abaixo dos 5°C, como por exemplo, as regiões alpinas, polares e de grandes profundidades oceânicas. A capacidade dos microrganismos de prosperar em ambientes frios é resultado de uma intensa adaptação para sobreviverem em baixas temperaturas (Feller e Gerday, 2003). O limite de temperatura mais baixa para a vida é em torno de -20°C, sendo que a atividade microbiana é restrita em locais onde a água não foi congelada devido às altas concentrações de sais encontradas. Apesar desse desafio, a vida prospera nesses ambientes, podendo encontrar microrganismos, tais como as bactérias Gram-negativas, principalmente as γ -proteobacteria (*Pseudomonas* spp. e *Vibrio* spp.). Também podem ser encontradas bactérias Gram-positivas como *Arthrobacter* sp. e *Micrococcus* sp., além de fungos (*Cryptococcus* spp.) (Vishniac e Klinger, 1986).

Microrganismos psicrotolerantes colonizam predominantemente regiões polares, principalmente os microrganismos do domínio Arquea (Karner *et al.*, 2001). Há estudos que mostram a existência de uma contínua adaptação desses microrganismos para viverem em ambientes extremamente frios, sendo que existem dois principais desafios para os microrganismos nesses ambientes: o primeiro deles é a temperatura baixa, que afeta a taxa das reações bioquímicas e enzimáticas, e o segundo é a viscosidade de ambientes aquosos, que é relativamente alta (D'Amico *et al.*, 2006). As membranas citoplasmáticas são, neste caso, mais fluidas para permitir o transporte de nutrientes na célula. A composição lipídica está diretamente relacionada às propriedades físicas das membranas, fazendo com que microrganismos psicrotolerantes produzam um maior teor de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, reduzindo o número de interações entre moléculas na membrana (Russell, 1997).

Outros fatores que podem ocorrer é o aumento do conteúdo de pigmentos carotenoides em estirpes de ambientes com extrema radiação UV (Chintalapati *et al.*, 2004) e também a presença de proteínas de choque frio, que resistem ao congelamento, já que as enzimas desses microrganismos precisam de flexibilidade para funcionar em temperaturas baixas. As proteínas anticongelantes têm a capacidade de se ligar a cristais de gelo através de uma grande superfície complementar (Jia e Davies, 2002), ajudando na prevenção da desnaturação e agregação de proteínas junto com a retenção de água (Phadtare, 2004), favorecendo a captura e a concentração de nutrientes. As proteínas são as moléculas que sofreram maior adaptação para que os

microrganismos psicrotolerantes possam viver em ambientes frios, pois controlam várias partes essenciais do metabolismo da célula, sendo essencial o enovelamento de proteínas para o controle da estrutura secundária do ácido nucleico.

Diferentemente das espécies psicrotolerantes, as espécies termotolerantes possuem, em sua maioria, estirpes bacterianas anaeróbicas e redutoras de sulfato. Porém, é possível encontrar estirpes com metabolismo aeróbico principalmente nas estirpes com crescimento entre 60°C a 80°C (Wang *et al.*, 2015). Esses microrganismos possuem modificações específicas para sobreviverem nessas condições de temperatura, tais como a seleção e a substituição de aminoácidos (Arnorsdottir *et al.*, 2009) e a presença de núcleos hidrofóbicos (Chen e Stites, 2004; Bezsudnova *et al.*, 2012).

Os microrganismos termotolerantes tiveram ao longo de anos de evolução o desafio de manter a estrutura de DNA estável, mesmo em altas temperaturas, possuindo então um sistema de reparo mais rigoroso do que encontrado em amostras mesófilas. Um exemplo disso é a substituição de bases dos ácidos nucleicos nas espécies *Thermus thermophilus* e *Sulfolobus acidocaldarius*, que ocorre com menos frequência para evitar mutações no genoma (Dranke, 2009; Kissling *et al.*, 2013). As enzimas destes microrganismos também são adaptadas para não ficarem inativas na presença de temperaturas elevadas, mostrando não só grande termoestabilidade, mas também atividade mesmo na presença de substâncias desnaturantes de proteína, como por exemplo, detergentes (Friedman *et al.*, 2004; Farhoud *et al.*, 2005).

Os mecanismos de proteção contra choque térmico estão onipresentes tanto em estirpes psicrotolerantes, quanto em estirpes termotolerantes, mostrando que são necessárias adaptações no genoma junto com uma combinação de diferentes estratégias para estes microrganismos colonizarem ambientes extremos. Os microrganismos extremófilos possuem diversas aplicações na indústria, devido a sua capacidade de sintetizar compostos bioativos com capacidade antimicrobiana e moléculas estáveis ao calor ou frio extremo (Gomes *et al.*, 2016). Esses microrganismos podem ser utilizados para a produção de biossurfactantes (Plaza *et al.*, 2006) e na degradação de biopolímeros (Andrade *et al.*, 1999), atuando em temperaturas consideradas extremas para os microrganismos mesófilos.

1.2.2. Estudos e aplicações biotecnológicas de microrganismos extremófilos

A associação de métodos moleculares e métodos tradicionais pode ser considerada a melhor abordagem para se compreender o metabolismo e o comportamento desses microrganismos extremófilos, desafiando os paradigmas da biologia moderna com questões como “Quais são os limites da vida?”. Na literatura, é relatado que o domínio Archaea é o principal grupo encontrado em ambientes extremos, sendo composto por microrganismos menos complexos do que bactérias, mostrando que a pressão seletiva dos ambientes extremos determinou quais bactérias sobreviveriam. Um exemplo de microrganismo do domínio Archaea que pode ser encontrado em ambientes com temperaturas e pH extremos é *Methanopyrus kandleri*, que cresce a temperaturas de até 122°C (Rampelotto, 2013).

Há estudos que buscam desvendar os mecanismos de adaptações das bactérias extremófilas. As bactérias que são adaptadas ao frio podem ser psicrófilas ou psicrotolerantes, possuindo algumas características em comum como: o aumento da fluidez de membrana; a capacidade de acumular solutos compatíveis e a expressão de proteínas de choque frio e proteínas anticongelantes (Casanueva *et al.*, 2010). Habitats polares geralmente são endêmicos, altamente vulneráveis e sensíveis a fatores externos, podendo levar a adaptação das células bacterianas, envolvendo elementos genéticos móveis (EGM), como os plasmídeos, que contribuem para a transferência horizontal de genes (THG) entre bactérias. Esses genes acessórios podem conferir uma vantagem evolutiva, sendo que já foram descritas na literatura estirpes bacterianas portadoras plasmídeos que foram isoladas de ambientes antárticos (Dziewit *et al.*, 2013; Moller *et al.*, 2014).

Além disso, os microrganismos psicrotolerantes são alvo de pesquisa como novas fontes de biomoléculas antimicrobianas (Horikoshi, 1995) e enzimas com grande potencial catalítico com interesse industrial (Lee *et al.*, 2017). Comparado com os antimicrobianos produzidos por mesófilos, os antimicrobianos produzidos por microrganismos psicrotolerantes são ativos em baixas temperaturas, fazendo com que esses microrganismos tenham uma vantagem competitiva no meio ambiente (O'Brien *et al.*, 2004). Algumas cepas de *Pseudomonas*, por exemplo, são produtoras de metabólitos secundários que afetam outros microrganismos, como as piocinas dos tipos S, R e F, podendo ser isoladas em diversos ambientes incluindo os ambientes extremos (Michel-Briand e Baysse, 2002; Ghequire e Mot, 2014).

A biotecnologia enzimática está presente em diversos setores na indústria, utilizando, em sua maioria, enzimas mesofílicas. Porém, a desvantagem do uso desse tipo de enzima é a baixa estabilidade em altas temperaturas ou pH extremos. Por essa razão, há uma necessidade de pesquisas em enzimas mais estáveis e com aplicações nas indústrias (Cabrera e Blamey, 2018). Uma abordagem para otimizar processos industriais em temperaturas mais elevadas seria a utilização de enzimas de microrganismos extremófilos, que são mais estáveis que as enzimas de microrganismos mesófilos. A Antártica possui, em sua maioria, ambientes com temperaturas extremamente frias, mas também é sítio de fontes termais, fumarolas e vulcões inativos, sendo extremamente adequado para o desenvolvimento de microrganismos extremófilos. Há relatos na literatura da produção de enzimas resistentes a faixas extremas de temperatura/pH, solventes orgânicos/proteolíticos e a metais pesados. Essas enzimas são, em sua maioria, pertencentes ao tipo Serina, sendo produzidas por microrganismos do domínio Archaea dos gêneros *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Pyrobaculum* e *Staphylothermus* (Cowan *et al.*, 1987; Völk *et al.*, 1994; Mayr *et al.*, 1996; Foophow *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2014).

Estudos com microrganismos extremófilos estão relacionados com a procura por produtos que tenham aplicações industriais, principalmente na próxima geração da biotecnologia industrial (Chen e Jiang, 2018), que necessitará de enzimas adaptadas a condições de temperaturas extremas e produtos extracelulares, como por exemplo, polímeros, que podem ser produzidos por microrganismos extremófilos (Tropeano *et al.*, 2013). As enzimas de microrganismos psicrotolerantes tornaram-se interessantes do ponto de vista industrial por atuarem em baixas temperaturas, enquanto as enzimas de microrganismos termotolerantes podem atuar em temperaturas elevadas sem que ocorra a desnaturação destes, podendo ser utilizadas na indústria como enzimas de hidrólise de polímeros (ex: enzimas amilolíticas e hemicelulolíticas) (Andrade *et al.*, 1999). As bactérias termofílicas dos gêneros *Caldicellulosiruptor*, *Thermotoga* e *Thermus* estão entre os microrganismos mais estudados. Porém, as novas ferramentas baseadas na análise de sequências podem proporcionar a oportunidade de ir além, estudando novos microrganismos e suas aplicações na bioengenharia (Counts *et al.*, 2017) em bioprocessos em temperaturas extremas, consequentemente diminuindo a contaminação por microrganismos mesófilos (Straub *et al.*, 2017).

1.3. Bactérias resistentes a antibióticos

1.3.1. História e impacto na sociedade

As bactérias estão intrinsecamente ligadas à vida dos organismos e aos ambientes em que habitam, sendo que alguns destes microrganismos podem ser benéficos ao hospedeiro. Porém, outras espécies podem causar doenças e são prejudiciais aos ambientes que colonizam. O tempo acelerado de crescimento microbiano aumenta as chances de ocorrerem mutações e a seleção de estirpes resistentes à antibióticos. A resistência aos antibióticos está presente naturalmente em algumas espécies bacterianas, tanto em amostras clínicas, quanto em amostras ambientais, porém, com o passar dos anos, a pressão seletiva do uso intensivo de antibióticos ocasionou a adaptação de diversas bactérias para sobreviver na presença de alguns tipos específicos de fármacos. Um dos fatores que contribuem para este processo de resistência é o uso indiscriminado de antibióticos, principalmente no ambiente hospitalar, aumentando a pressão seletiva e facilitando a aquisição de mecanismos de resistência através de plasmídeos (Landecker, 2016).

Dessa forma, a crescente resistência aos antimicrobianos em bactérias clínicas tem gerado grande preocupação na área da saúde em todo o mundo, principalmente com o surgimento das cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA (resistência à meticilina) e *Enterobacteriaceae* ESBL (produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado). A partir de 1990, o tratamento de algumas infecções bacterianas tornou-se mais difícil por causa da disseminação da resistência bacteriana e da ocorrência de infecções em pacientes imunodeficientes (infectados com o vírus HIV, por exemplo), que são frequentemente afetados por infecções relacionadas aos cuidados com a saúde, fazendo com que as drogas antimicrobianas se tornassem menos efetivas (Santos, 2004).

Uma das subclasses mais potentes de antibióticos, as carbapenemas, está tendo seu uso comprometido pelo surgimento de bactérias resistentes em unidades de tratamento intensivo (UTI), como *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Isso mostra uma preocupação crescente, principalmente a respeito de bactérias gram-negativas, enfatizando a importância de otimizar o uso de antimicrobianos e pesquisar novas drogas eficazes para combater esses microrganismos (Rice, 2009).

O problema das bactérias se tornarem resistentes a antibióticos não é recente. Já em 1940, a produção em escala industrial de antibióticos contribuiu para a utilização de fármacos em larga escala na sociedade e, com isso, houve o surgimento de cepas bacterianas resistentes. O Centro Americano de Controle de Doenças (CDC) alertou que o uso indiscriminado de antibióticos gera cepas de bactérias resistentes (CDC, 2013) e que a resistência aos antibióticos tem uma consequência ecológica coletiva (Fortun, 2012), afetando a comunidade microbiana e selecionando estirpes no ambiente. Os antibióticos foram um elemento construtivo de um período triunfal da medicina, principalmente a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Os antibióticos foram utilizados em larga escala durante a segunda guerra mundial, representando uma revolução biotecnológica que proporcionou avanços científicos e prolongou o tempo de vida de muitas pessoas na época. O exército americano produziu penicilina em escala industrial, investindo em pesquisas para encontrar cepas de alto rendimento. Dessa forma, em 1944, existia quantidade suficiente de penicilina para tratar os soldados do exército americano e, em 1945, foi disponibilizado para a população civil nos EUA (Neushul, 1993). Em tempos de guerra, a penicilina era largamente utilizada, sendo referida como “salvadora dos soldados”, mas ao longo dos anos esse uso em larga escala contribuiu para o surgimento de estirpes resistentes.

Além de todo o contexto de utilização de antibióticos para conter doenças que acometiam humanos, os antimicrobianos também foram utilizados na pecuária. A criação intensiva de animais, a ocorrência de inúmeras infecções e o nível de estresse nos animais resultaram no surgimento de doenças infecciosas, fazendo com que a utilização de antimicrobianos se tornasse uma ferramenta essencial na contenção de doenças. Com isso, o uso destes antimicrobianos na pecuária também gerou consequências graves, como a seleção de estirpes resistentes a antibióticos (Hao *et al.*, 2014).

O uso indiscriminado dessas drogas, tanto na área da saúde quanto na área de criação de animais, resultou na seleção de estirpes resistentes, isso pode ter ocorrido devido à transmissão de plasmídeos de resistência, selecionando quais microrganismos sobreviveriam naquele ambiente (Orzech e Nichter, 2008).

1.3.2. Classes de antibióticos e mecanismos de resistência

Antibióticos são moléculas orgânicas, geralmente de baixa massa molecular (< 1.000 daltons), que possuem atividade antibacteriana contra diferentes espécies de microrganismos (Tabela 2). Existem diversos antibióticos, cada qual possui um mecanismo de ação para matar ou inibir o patógeno alvo: bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de micobactérias. Estes antibióticos podem ter ação bactericida (matando o microrganismo) ou bacteriostática (inibindo o crescimento e a proliferação, mas não matando os microrganismos). Uma propriedade desejável em antibióticos é a morte seletiva da bactéria que está causando a infecção no hospedeiro, não interferindo no organismo ou na microbiota local (Walsh e Wencewicz, 2016).

Tabela 2 – Lista dos principais patógenos bacterianos encontrados em infecções hospitalares e as doenças que causam. Adaptado de Von Nussbaum *et al.* (2006).

Patógeno	Principais doenças associadas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecções de pele, abscessos, bacteremia, pneumonia, endocardite e síndrome do choque tóxico
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Meningite e infecções respiratórias, como pneumonia, otite e sinusite
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteremia, endocardite, infecção urinária e peritonites
<i>Escherichia coli</i>	Bacteremia, endocardite, peritonites
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia e bacteremia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pneumonia e bacteremia
<i>Acinetobacter</i> spp.	Pneumonia em pacientes imunocomprometidos

Os antibióticos podem ser classificados como: sintéticos, naturais e semissintéticos. Os antibióticos sintéticos pertencem a diferentes classes, a primeira delas é das sulfonamidas, que começaram a ser utilizadas na década de 1930. Essa classe de antibióticos atua no bloqueio de uma enzima chave na biossíntese bacteriana de ácido fólico, interrompendo a síntese do DNA. A segunda classe de antibióticos sintéticos é a das fluoroquinolonas, utilizadas em tratamentos de infecções no trato

urinário e no trato respiratório, bloqueando a replicação do DNA bacteriano. A terceira classe de antibióticos sintéticos é a das oxazolidinonas, os membros dessa classe são utilizados no tratamento de pneumonia hospitalar e pneumonia adquirida em infecções por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, bloqueando a síntese de proteínas bacterianas (Walsh e Wencewicz, 2016). O arranjo químico destas três classes de antibióticos está esquematizado na Figura 1.

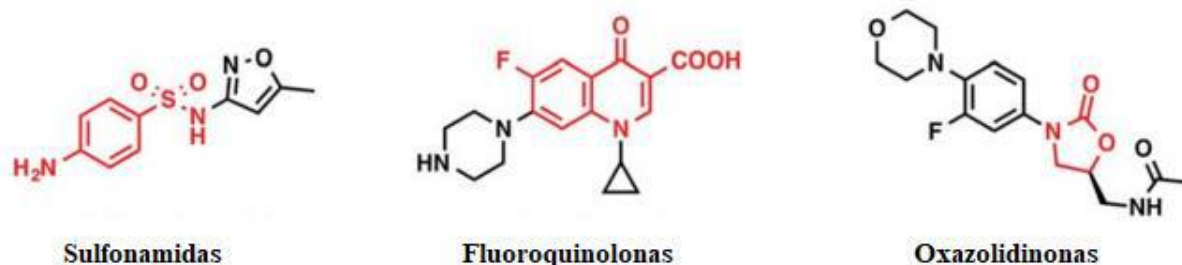


Figura 1 – Classes de antibióticos sintéticos em uso clínico humano: sulfonamidas, introduzidas na década de 1930; fluoroquinolonas, introduzidas em 1960; e oxazolidinonas, introduzidas na década de 1990. Adaptado de Walsh e Wencewicz (2016).

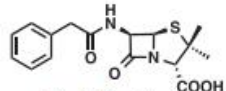
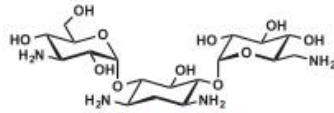
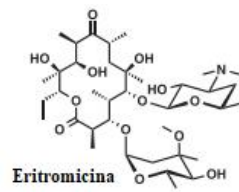
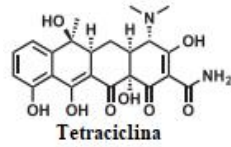
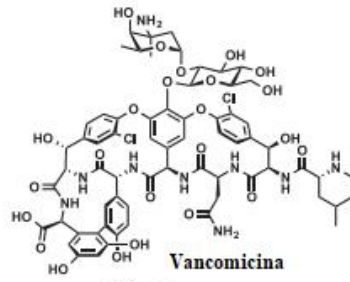
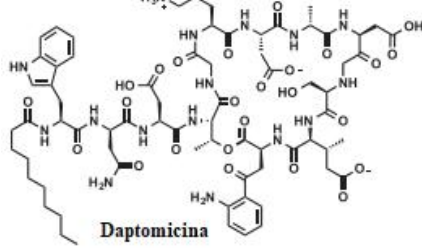

Além dos antibióticos sintéticos, também existem antibióticos naturais, que são produzidos por bactérias e fungos, com o objetivo de combater estirpes de bactérias antagonistas. Com isso, as bactérias e fungos produtores de antimicrobianos conseguem, de forma seletiva, dominar o ambiente e aumentar seu crescimento populacional. As bactérias produtoras de antibióticos naturais podem ser utilizadas para a produção em escala industrial de antibióticos, através de técnicas de cultivo em biorreatores e de purificações. Existem diferentes classes de antibióticos, sendo a mais conhecida a classe dos β -lactâmicos, que tem como alvo a parede celular bacteriana, impedindo a síntese do peptidoglicano (Clardy *et al.*, 2009).

Os β -lactâmicos apresentam um sistema de anéis β -lactâmicos, impedindo a reação de transpeptidação (Fernandes *et al.*, 2013), que representa uma etapa importante da síntese da parede celular bacteriana, possuindo quatro subclasses: os penicilínicos (ex: Penicilina e Meticilina), Cefalosporinas (de 1º, 2º, 3º, 4º geração), os Carbapenêmicos (ex: Imipenem e Panipenem) e o Clavulanato. O ácido clavulânico impede a ação da enzima β -lactamase, que é produzida por bactérias resistentes a β -lactâmicos como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* MRSA resistente à metilina (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Em 1952, o microbiologista Selman Waksman ganhou o prêmio Nobel pela descoberta dos aminoglicosídicos, como por exemplo, a estreptomicina. Essa descoberta foi extremamente importante, sendo a primeira classe de antibióticos eficaz no tratamento de tuberculose (Woodruff, 2014). Esse antibiótico se une à unidade 30S ribossomal inibindo a síntese de proteínas, causando a morte celular da bactéria. Podemos encontrar também antibióticos da classe macrolídeo, como, por exemplo, a eritromicina, que também atua na inibição da síntese proteica. A classe das tetraciclina possui antibióticos naturais como a clortetraciclina, que foi isolada de estirpes de *Streptomyces* spp. Outra classe importante dos antibióticos naturais é a dos glicopeptídeos, representados pela vancomicina e a teicoplanina. Estes antibióticos alteram a permeabilidade da membrana plasmática e atuam na inibição da síntese do peptidoglicano. Podemos encontrar diversas classes de antibióticos, como foi apresentado até agora, possuindo diferentes mecanismos de funcionamento e diferentes aspectos de ação (Walsh e Wencewicz, 2016). Todos esses exemplos de antibióticos naturais são demonstrados na Tabela 3.

Entre 1980 até os dias atuais tem sido utilizadas ferramentas genômicas e triagem de coleções de compostos para a busca de novos antibióticos, em detrimento às triagens de produtos naturais gerados por bactérias e fungos. Porém, houve uma redução na identificação de novos protótipos antibióticos e um aumento na incidência de resistência bacteriana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas surgiu no mercado farmacêutico: a linezolida (Payne *et al.*, 2007). A pesquisa por antibióticos naturais é um grande desafio, principalmente com o surgimento de estirpes bacterianas resistentes aos fármacos atuais, sendo extremamente importante buscar novos fármacos e ao mesmo tempo sensibilizar a população sobre boas práticas de uso de antibióticos, para assim evitar o surgimento de futuras estirpes resistentes e garantir a aplicação adequada de antibióticos.

Tabela 3 – Lista dos principais antibióticos naturais utilizados na clínica médica humana e suas características. Adaptado de Walsh e Wencewicz (2016).

Ano de descobrimento	Classe	Alvo	Estrutura
1928	β -Lactâmicos	Transpeptidases (peptidoglicano)	 <p>Penicilina G</p>
1950	Aminoglicosídeos	Subunidade 30S ribossomal	 <p>Canamicina</p>
1952	Macrolídeos	Subunidade 50S ribossomal	 <p>Eritromicina</p>
1928	Tetraciclinas	Subunidade 30S ribossomal	 <p>Tetraciclina</p>
1958	Glicopeptídeos	Lipídeos	 <p>Vancomicina</p>
2003	Lipopeptídeos	Membrana bacteriana	 <p>Daptomicina</p>
1957	Policétidos	RNA polimerase	 <p>Rifamicina SV</p>

Após o aparecimento de bactérias resistentes à penicilina em 1950, começaram a ser produzidas penicilinas semissintéticas com amplo espectro de ação para atender à necessidade de combater bactérias resistentes a antibióticos, como a meticilina, oxacilina e ampicilina (Ligozzi *et al.*, 1991). Já foram documentadas algumas variações de penicilinas, sendo a penicilina G e a penicilina V produzidas naturalmente por fungos *Penicillium* spp. e outras penicilinas semissintéticas, como a cloxacilina e a carbenicilina produzidas industrialmente (Noga e Silphaduang, 2003). Os antibióticos semissintéticos apresentam melhor atividade em consequência das modificações estruturais (Rodrigues, 2013), fazendo com que eles sejam bastante utilizados no mercado farmacêutico (Wright *et al.*, 2014).

A classificação dos antibióticos semissintéticos é baseada no mecanismo de ação. Eles podem ser separados em cinco categorias: inibição da síntese da parede celular (ex: β -lactâmicos); inibição da síntese da membrana plasmática (ex: Polimixinas); inibição da síntese proteica (ex: Aminoglicosídeos); alteração de metabolismos celulares (ex: Sulfonamidas); alterações na síntese dos ácidos nucleicos (ex: Quinolonas) (Brody, Lerner e Minneman, 1998). O esquema representativo dos diferentes mecanismos de ação dos antibióticos está representado na Figura 2.

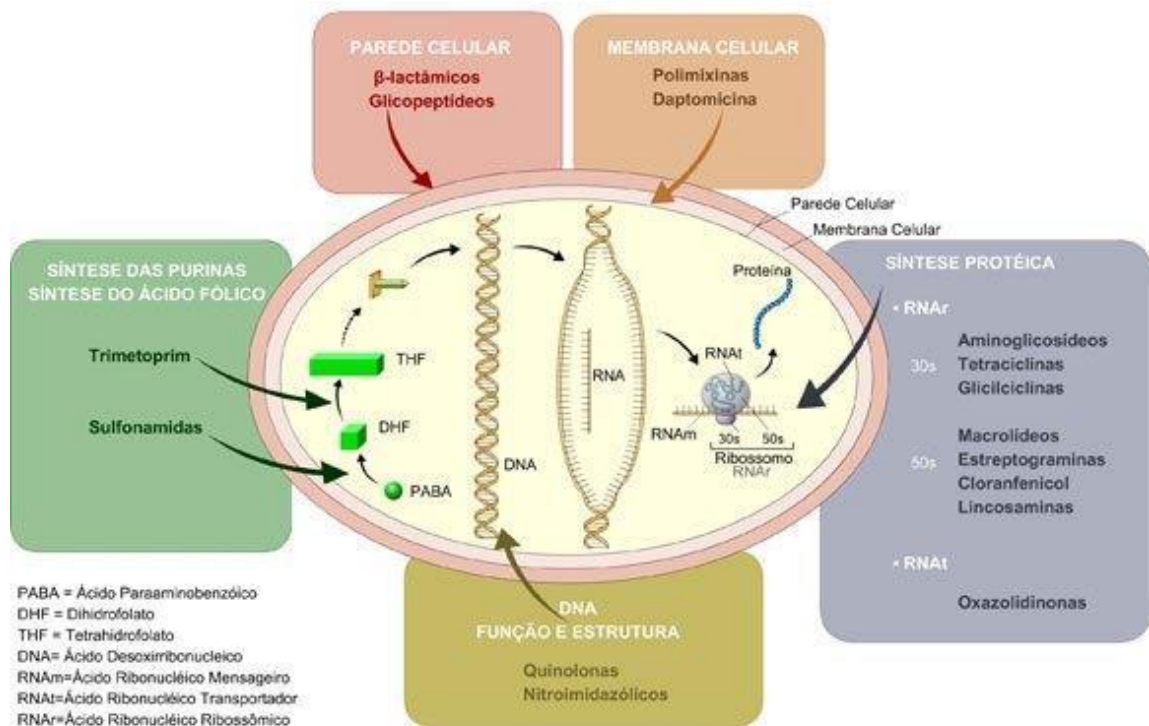


Figura 2 – Esquema representando os diversos mecanismos de ação de antibióticos. (ANVISA, 2007).

As bactérias, através da pressão seletiva, apresentam diferentes mecanismos de resistência a antibióticos. A resistência aos antimicrobianos pode ser classificada em dois grupos:

- a) Resistência intrínseca: O microrganismo é resistente a alguns tipos de antibióticos, isso porque os mecanismos celulares necessários para a sensibilidade estão ausentes na célula. Exemplo: *Mycoplasma* spp. é resistente à penicilina G benzatínica por não ter parede celular (Vaz, 2009). Outro exemplo de resistência constitutiva ocorre em bactérias Gram-negativas resistentes à vancomicina. Essa resistência ocorre devido à presença da membrana externa e do espaço periplasmático, fazendo com que a ação das β -lactamases seja menos eficaz.
- b) Resistência adquirida: O microrganismo pode adquirir a resistência através de cinco mecanismos (Vaz, 2009).

O primeiro deles é a mutação, que é um evento espontâneo que envolve mudanças na sequência de DNA cromossômico.

O segundo mecanismo que pode ser utilizado é a transformação, que é uma transferência genética no qual um DNA é transferido de uma célula resistente para uma célula não resistente, alterando o genótipo do receptor. Sequências curtas de DNA, conhecidas como transpósons, podem ser transferidas desta maneira.

O terceiro mecanismo que pode ser utilizado é a transdução, que é um processo pelo qual o DNA de um plasmídeo é incorporado por um bacteriófago e então transferido para outra bactéria.

O quarto mecanismo que pode ser utilizado é a conjugação, que é um processo de transferência genética, mediado por contato celular. A bactéria doadora sintetiza um pili-sexual (no caso de bactérias Gram-negativas) ou substâncias de agregação (no caso de bactérias Gram-positivas), ligando-se a uma bactéria receptora em um processo de transferência de cópias de genes plasmidiais.

O quinto e último mecanismo que pode ser utilizado é a transposição, pelo qual os transpósons, que são segmentos curtos de DNA, podem transpor de um plasmídeo para um cromossomo e vice-versa. Durante esse processo, os transpósons podem incorporar genes de resistência.

1.4. Peptídeos antimicrobianos

1.4.1. Classificação e características de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Desde os anos 50 é relatada a produção de substâncias com atividade antimicrobiana, como os biossurfactantes e as proteases (ex: termolisinas). Algumas bactérias são capazes de produzir substâncias durante seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para estirpes do mesmo gênero, quanto para outros gêneros bacterianos (Jack *et al.*, 1995). O termo bacteriocina foi introduzido na década de 1950 por François Jacob e colaboradores (Jacob *et al.*, 1953). As bactérias do ácido láctico são as mais estudadas (ex: *Lactococcus lactis*), por serem consideradas seguras para o consumo humano, já que muitas destas podem ser encontradas em alimentos fermentados, como queijos e derivados de leite. Apesar de o termo bacteriocina ser frequentemente associado aos peptídeos antimicrobianos ribossomicamente sintetizados por bactérias do ácido láctico, a primeira bacteriocina a ser documentada foi uma colicina, descrita em 1925 a partir da bactéria Gram-negativa classificada como *E. coli*, que inibiu o crescimento de outra cepa de *E. coli* (Gratia, 1925). O termo “colicina” foi nomeado para este efeito inibitório em *Escherichia coli*, sendo originalmente retirado de “Coli-Killer”, ou seja, matadora de *E. coli* (Watson *et al.*, 1981). Além das colicinas, muitas outras bacteriocinas produzidas por microrganismos, patogênicos ou não, que inibem outros microrganismos foram identificadas. Sendo assim, a produção de bacteriocinas não se restringe apenas às bactérias Gram-positivas (Hardy, 1975).

As bacteriocinas, ou peptídeos ribossomicamente sintetizados por bactérias, são diferentes de antibióticos, pois estes últimos são sintetizados por enzimas e, geralmente, possuem amplo espectro. As bacteriocinas, por sua vez, conseguem matar bactérias em concentrações nanomolares (10^{-9}), enquanto antibióticos são necessários em concentrações micromolares (10^{-6}). Uma subdivisão importante nos grupos de bacteriocinas é a separação entre as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas e por bactérias Gram-positivas. Dentro do grupo das bactérias Gram-positivas, as bacteriocinas de bactérias do ácido láctico têm uma importância enorme no uso em alimentos, inibindo patógenos como a *Listeria monocytogenes*. Contudo, não são utilizadas apenas em alimentos, algumas possuem atividade contra patógenos multirresistentes à meticilina, como no caso da *Staphylococcus* (MRSA) e o

Enterococcus, resistente a vancomicina (VRE). Dessa forma, as aplicações de bacteriocinas possuem potencial tanto na área médica, quanto na área de alimentos e veterinária, como mostra o esquema da Figura 3 (Parada *et al.*, 2007).

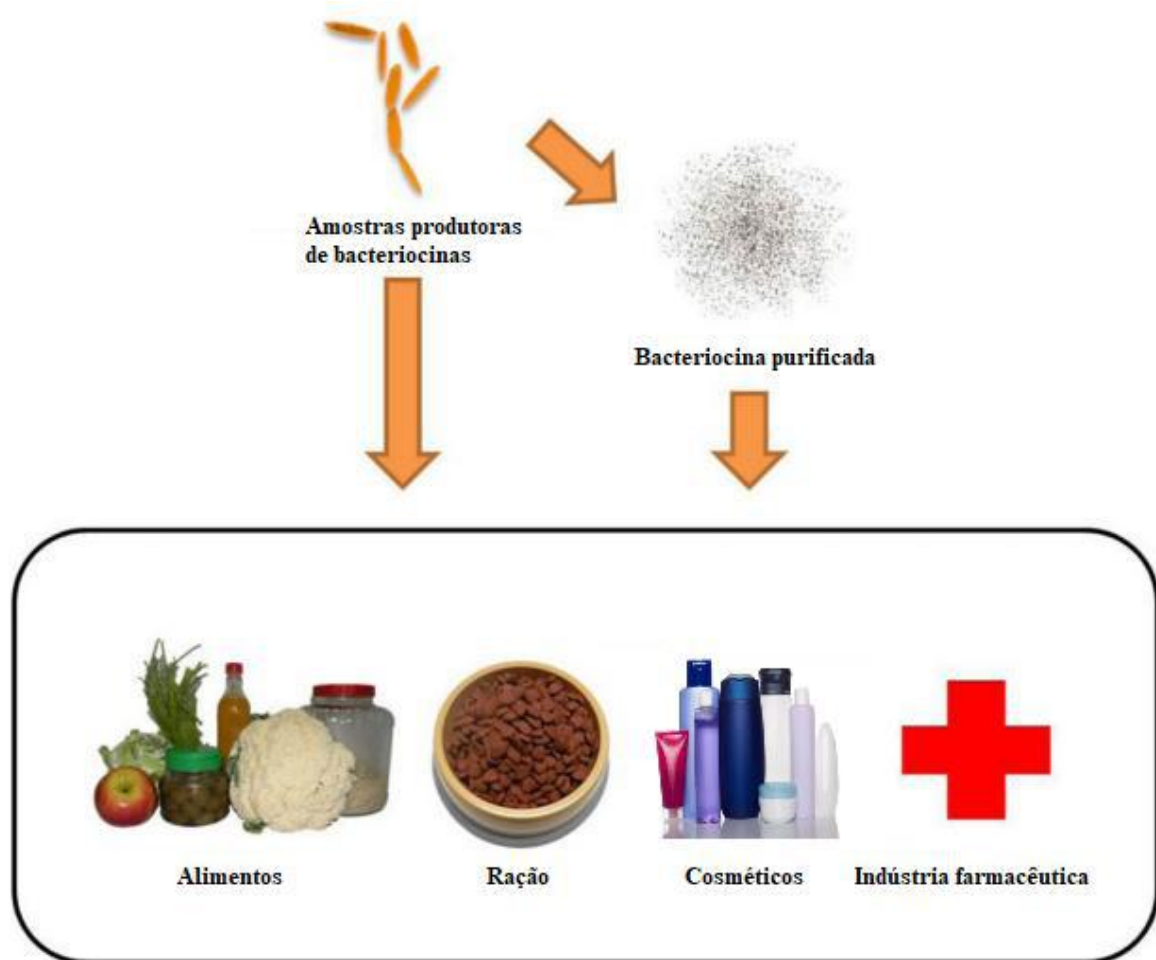


Figura 3 – Aplicação das bacteriocinas em diferentes áreas. Nesse esquema, é possível visualizar as principais aplicações de bacteriocina em diferentes segmentos na indústria. As bacteriocinas podem ser utilizadas como antimicrobianos em alimentos, rações para animais, cosméticos e na indústria farmacêutica, além de existirem estudos envolvendo a aplicação na terapia contra alguns tipos de câncer (Kaur e Kaur, 2015). Adaptado de Yang *et al.* (2014).

As bacteriocinas lantibióticas foram descritas na década de 20. Porém, a caracterização da estrutura de sua principal representante, a nisina, só foi determinada mais de 50 anos depois, em 1971 (Klerk e Smit, 1967; Gross e Morell, 1971), como podemos observar na Figura 4. Dessa forma, por possuir maior número de estudos, principalmente por conta das bactérias do ácido láctico, as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas possuem uma classificação mais robusta, demonstrada na Tabela 4. Podemos classificar as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas em quatro classes (Cotter *et al.*, 2005):

- a) Classe I: São os Lantibióticos, que possuem baixa massa molecular (< 5 kDa), modificações pós-transducionais e são termoestáveis. Essa classe de bacteriocinas possui menos de 28 aminoácidos (< 5 kDa) de estrutura linear, estes possuindo aminoácidos modificados como a lantionina. Possuem duas subclasses: Lantibióticos A, como a nisina (2-4 kDa), e os Lantibióticos B, como a mersacidina (2-3 kDa). (Chatterjee *et al.*, 1992; Chatterjee *et al.*, 2005).
- b) Classe II: São os peptídeos que não possuem lantionina, têm baixa massa molecular (até 10 kDa) e não possuem modificações pós-transducionais. São estáveis ao calor, tendo de 30 a 60 aminoácidos, apresentando quatro subclasses no total: IIa, como a pediocina; IIb, como a lactacina; IIc, que são bacteriocinas cíclicas como a carnociclina; IId, que são bacteriocinas lineares não semelhantes à pediocina, como a lactococina (Cotter *et al.*, 2013).
- c) Classe III: São bacteriocinas de alta massa molecular (> 30 kDa), com proteínas lábeis. Exemplos de bacteriocinas desse grupo são as megacinas e a helveticina. Essas bacteriocinas podem ser divididas em duas subclasses: IIIa, das enzimas bacteriolíticas, e a IIIb, das proteínas não líticas (Ogaki e Maia, 2015).
- d) Classe IV: Foi proposta como o grupo das bacteriocinas com grandes cadeias proteicas e porções lipídicas (Klaenhammer, 1993). Essa classificação original foi contestada e diversas modificações foram feitas no sistema de classificação desde então, como a exclusão das bacteriocinas de Classe IV (Nes *et al.*, 2007), por não terem sido caracterizadas. Porém, em 2014, começou a ser sugerida a introdução dessa classe (Gabrielsen *et al.*, 2014).

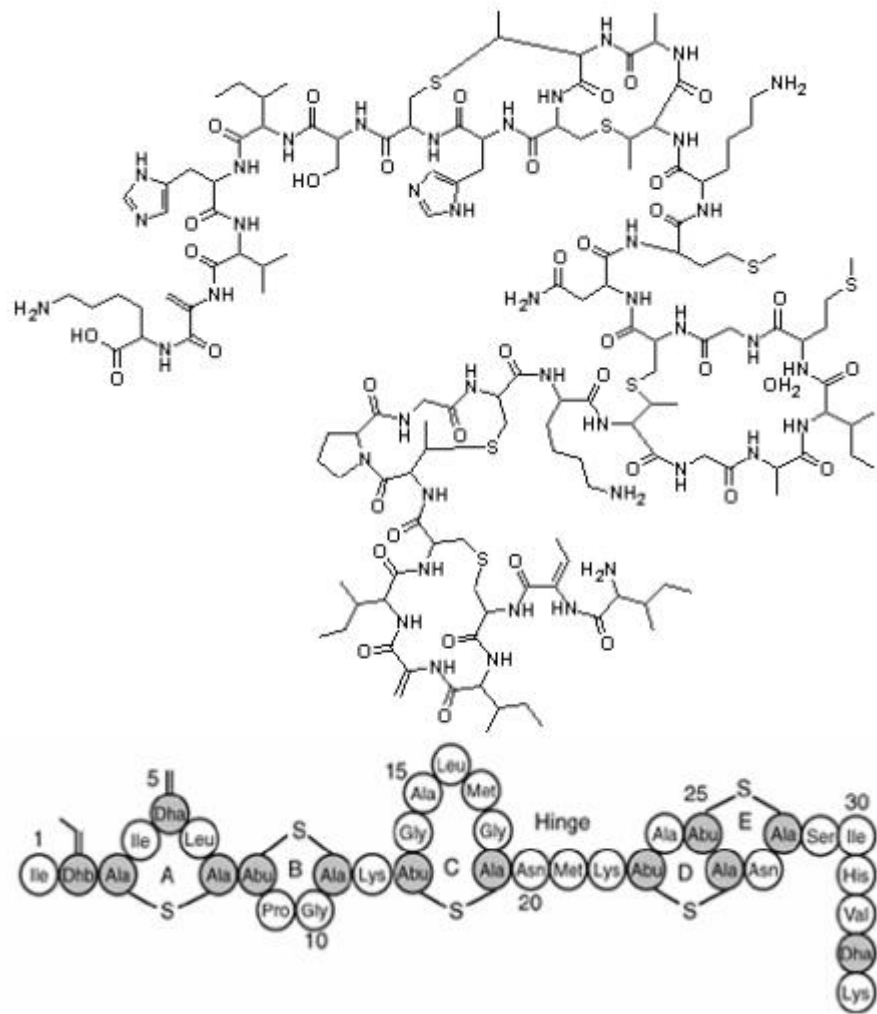


Figura 4 – Estrutura primária da Nisina. Retirado de Parada *et al.* (2007).

Tabela 4 – Esquema de classificação original de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas. Adaptada de Klaenhammer (1993).

Classe	Descrição	Características
Classe I	Bacteriocinas com modificações pós-traducional ou Lantibióticos	Contém os aminoácidos incomuns lantionina, β-metil lantionina e resíduos desidratados
Classe II	Peptídeos não modificados	Peptídeos termoestáveis ativos em membrana pequenos (< 10 kDa)
Classe III	Proteínas grandes não modificadas e termo-lábeis	Proteínas lábeis grandes (> 30 kDa)
Classe IV	Proteínas complexas ou complexos de bacteriocina	Contém metades lipídicas ou carboidratos

A classificação das bacteriocinas de bactérias Gram-negativas é menos robusta, por causa de se ter menos estudos envolvendo este grupo de microrganismos, já que as bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico, devido à sua importância na indústria de alimentos, foram as mais estudadas, tornando a elaboração de uma classificação mais fácil. Em bactérias Gram-negativas, com exceção de colicinas, a classificação baseada em critérios semelhantes é mais difícil, devido à grande heterogeneidade estrutural das microcinas. Dessa forma, as bactérias Gram-negativas são divididas em dois grupos, sendo o primeiro das colicinas e o segundo das microcinas:

- a) Colicinas: As colicinas são as bacteriocinas mais estudadas de bactérias Gram-negativas, sendo proteínas bactericidas de alta massa molecular (30-80 kDa), produzidas por muitas cepas de *Escherichia coli* em períodos de estresse ou em cepas portadoras de plasmídeo colicinogênico (Drider e Rebuffat, 2011). Desde 1963, foram identificadas diversas colicinas que apresentavam diferentes modos de ação (Nomura, 1963). A classificação das colicinas depende do seu mecanismo de ação, podendo matar a célula alvo através de três mecanismos principais: o primeiro é fazendo canais dependentes de voltagem na membrana interna das bactérias alvo; o segundo é através de ações de nuclease no citoplasma e a terceira é por degradação do peptidoglicano (Cascales *et al.*, 2007). As colicinas são organizadas em três domínios: o primeiro domínio é o da translocação amino-terminal (T), que está relacionado com a proteína translocadora de membrana externa; o segundo domínio é de ligação ao receptor central (R); o terceiro domínio é o citotóxico carboxi-terminal (C), que tem atividade antimicrobiana (Cascales *et al.*, 2007; Kleanthous, 2010). Proteínas de imunidade específica são produzidas para conferir imunidade à célula produtora. A maioria das colicinas são codificadas por plasmídeos, enquanto poucas são codificadas por genes cromossômicos. Um cluster gênico de colicina codifica a proteína imunitária, a proteína de transporte e a proteína citotóxica (Guasch *et al.*, 1995).

b) Microcinas: São proteínas ribossomicamente sintetizadas, de baixa massa molecular (1-10 kDa) e hidrofóbicas, diferentes das proteínas tipo colicinas, que têm alta massa molecular (25-80 kDa). As microcinas podem ou não passar por processos pós-traducionais, são produzidas predominantemente por *Enterobacteriaceae*, sendo resistentes ao calor, extrema faixa de pH e proteases (Rebuffat, 2012). Podem formar poros e agir como inibidores da síntese proteica na célula alvo. Nenhum gene de microcina possui gene de lise correspondente, sendo secretadas para fora da célula produtora através de um sistema de secreção ABC (Duquesne *et al.*, 2007). As microcinas podem ser classificadas em duas classes: Classe I, de baixa massa molecular (< 5kd), com modificações pós-traducionais; Classe II, de alta massa molecular (5-10kd), com duas subclasses (IIa e IIb) (Pons *et al.*, 2002; Vassiliadis *et al.*, 2010).

A classificação cronológica das bacteriocinas pode ser visualizada na Figura 5, mostrando as diversas alterações que foram realizadas ao longo dos anos, enquanto o esquema exemplificando os mecanismos de ação das bacteriocinas é apresentado na Figura 6.

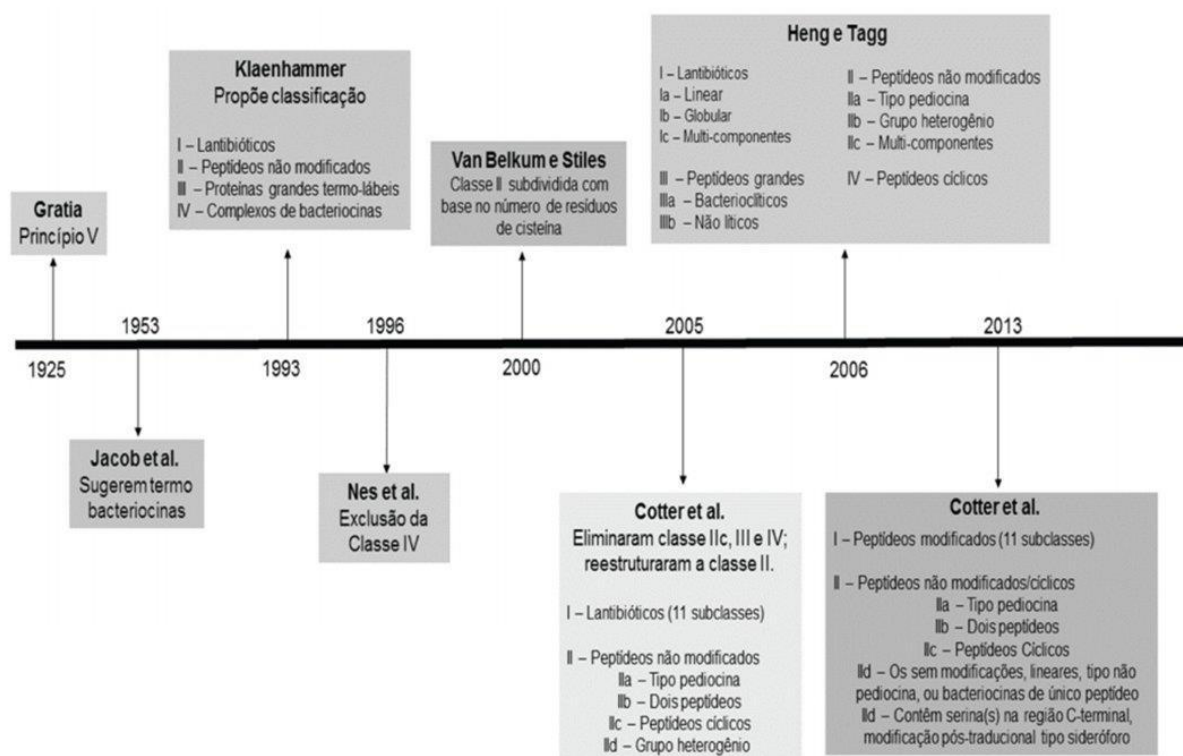


Figura 5 – Propostas de classificação das bacteriocinas que vem sendo apresentadas ao longo do tempo. Retirado de Ogaki e Maia (2015).

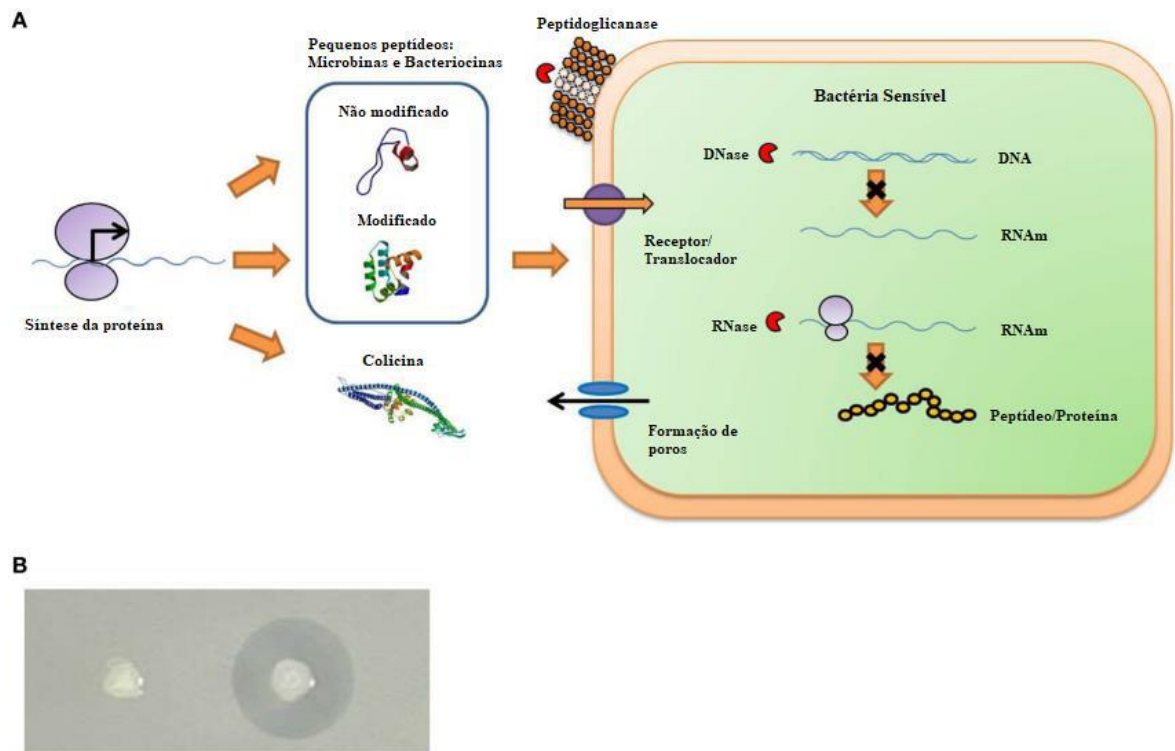


Figura 6 – Esquema mostrando o sistema de funcionamento de uma bacteriocina. (A) O processo de produção simplificado. As bacteriocinas são sintetizadas no ribossomo e liberadas para o meio extracelular, ligando-se ao receptor na superfície da célula bacteriana sensível aquele peptídeo e ocasionando sua morte celular ao formar poros na membrana, agir como nucleases, alterar a função do peptidoglicano etc. (B) Quando ocorre o crescimento em placa da bactéria produtora junto com a bactéria sensível, ocorre a produção de uma zona de inibição ao redor da cepa produtora, não havendo halo na cepa controle não produtora de bacteriocina. Adaptado de Yang *et al.* (2014).

1.4.2. Aplicações biotecnológicas de substâncias antimicrobianas na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica

Desde os anos 50, já era conhecido que bactérias do gênero *Lactobacillus* produzem bacteriocinas (Thornley e Sharpe, 1959). A aplicação dessas substâncias antimicrobianas desde então tem sido bastante estudada, principalmente das bactérias do ácido lático, que são microrganismos Gram-positivos que produzem uma grande diversidade de classes de bacteriocinas, como a nisina, pediocina Pa-1 e a lacticina 3147 (Field *et al.*, 2010), sendo reconhecidas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que essas bacteriocinas podem ser utilizadas como conservantes alimentares, principalmente pelo fato de que as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas são isoladas de alimentos fermentados e podem ser considerados GRAS (*Substances Generally Recognized as Safe*), ou seja, seguras para o consumo humano (Schulz *et al.*, 2003).

Além do uso de bactérias ácido-láticas, há estudos com bacteriocinas de microrganismos psicrófilos (Lee *et al.*, 2017). A busca por conservantes mais naturais em alimentos, que não trazem efeitos colaterais nem grande toxicidade, faz com que algumas bacteriocinas e microrganismos produtores ganhem reconhecimento como uma potencial fonte de bioconservantes (Moreno *et al.*, 1999), principalmente em alimentos congelados, nos quais a temperatura pode variar entre -15°C a -20°C. O potencial uso dessas bacteriocinas em alimentos deve ser avaliado através de testes para verificar sua patogenicidade, estabilidade a temperaturas, pH e espectro de ação, avaliando se esta é afetada quando ocorre mudanças na solubilidade, se é inativada por ação de proteases ou se ocorrem alterações quando exposta aos componentes dos alimentos (Ross *et al.*, 1999). Para o uso em indústrias alimentícias, é necessária uma autorização para regulamentar o uso dessas bacteriocinas em alimentos, sendo que, nos Estados Unidos, o uso de bacteriocinas purificadas ou de microrganismos produtores de bacteriocinas estão sob jurisdição do FDA, sendo regulamentadas como ingredientes alimentares pela FFDCA (*Federal Food, Drug and Cosmetic Act*) que as classifica como GRAS (Fields, 1988). No Brasil, a legislação brasileira permite o uso de nisina em queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/Kg (DOU, 1996)

Há relatos na literatura do estudo de bacteriocinas combinadas com óleo essencial de plantas para melhorar a ação bactericida. Esses óleos essenciais são substâncias naturais complexas, ricas em compostos fenólicos com forte odor,

podendo ter ação bactericida, fungicida e outras propriedades medicinais (Bakkali *et al.*, 2008). Entretanto, o uso de óleos essenciais e seus derivados em alimentos são limitados devido a alterações sensoriais.

Atualmente, nas indústrias alimentícias, vem sendo empregada uma técnica de processamento de alimentos em alta pressão (HPP – *High Pressure Processing*) em alimentos enlatados, para eliminar ou inativar microrganismos. O tratamento HPP não inativa completamente os microrganismos em alguns casos, podendo ser associado então a compostos antimicrobianos (Patterson, 2005). Uma das alternativas é o uso de bacteriocinas, pois a alta pressão desestabiliza a membrana externa, aumentando a atividade de bacteriocinas em bactérias Gram-negativas. Esse processo foi observado por Patterson (2005) quando realizou a associação da nisina com alimentos e os submeteu a alta pressão. Nestas condições, ocorre maior sensibilidade de microrganismos patogênicos como a *Escherichia coli* (Masschalck *et al.*, 2000). Essa sensibilidade pode ser transitória, ocorrendo apenas no período em que a bactéria Gram-negativa estiver submetida à alta pressão, fazendo com que o uso simultâneo de bacteriocinas em HPP seja recomendado. Além disso, a sensibilidade pode variar de uma espécie para outra, existindo relatos de que a bactéria da espécie *Pseudomonas fluorescens* demonstrou maior sensibilidade que a bactéria da espécie *E. coli* quando submetido tratamento de HPP em amostras de leite (Black *et al.*, 2005). Dessa forma, o uso de bacteriocinas em associação com outros compostos químicos ou com tratamentos físicos permite ampliar o espectro de ação desses peptídeos, além de minimizar o surgimento de estirpes resistentes, havendo necessidade de estudar formas eficazes de aplicação dessa tecnologia em diferentes matrizes alimentares (Prudêncio *et al.*, 2015).

Além do uso de bacteriocinas em alimentos, nas últimas décadas tem se buscado novos fármacos capazes de combater microrganismos multirresistentes a drogas, fazendo com que as bacteriocinas passem a ser vistas como uma solução alternativa para esse problema. Devido ao seu espectro seletivo e a diversidade de bacteriocinas encontradas na natureza, o uso de bacteriocinas para combater infecções resistentes é uma perspectiva promissora, visto que afeta diretamente o microrganismo patogênico e não espécies comensais que possam estar no hospedeiro, favorecendo também a redução da seleção para a resistência a antibióticos (Riley e Wertz, 2002).

1.5. Gênero *Pseudomonas*

1.5.1. Características do gênero

O gênero *Pseudomonas* é composto por microrganismos bacterianos Gram-negativos da família Pseudomonadaceae (Palleroni *et al.*, 1973), pertencentes à classe Gammaproteobactéria do filo Proteobacteria. Dentro desse gênero, as espécies mais estudadas são: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. marginalis* e *P. putida*. Algumas dessas espécies são patogênicas, como a *P. aeruginosa*, causando infecções respiratórias, urinárias e bacteremias oportunistas (Tabela 5). As *Pseudomonas* são bastonetes ligeiramente curvos, podendo ser observado células isoladas ou em pares, tendo mobilidade através do flagelo polar monotríqueo (Pollack, 1995). As *Pseudomonas* podem ser encontradas em diversos ambientes, já que esse gênero não se restringe a apenas bactérias patogênicas, podendo ser identificadas estirpes ambientais no solo e em ambientes aquáticos. É possível encontrar também estirpes de *Pseudomonas* em ambientes com temperaturas extremamente baixas, mostrando a versatilidade desse gênero em colonizar os mais variados ambientes.

A ordem Pseudomonadales contém microrganismos que são quimiorganotróficos e que realizam metabolismo oxidativo. Dessa forma, as espécies dessa ordem podem crescer de forma aeróbia e são, na maioria das vezes, oxidases e catalases positivas, embora algumas espécies sejam capazes de realizar respiração anaeróbia utilizando nitrato como aceptor final de elétrons (Madigan *et al.*, 2016).

Tabela 5 – Características de algumas das principais espécies de *Pseudomonas* (Madgan *et al.*, 2016).

Espécie	Características
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Possuem flagelo polar único, realizam desnitrificação, produzem piocianina, crescimento em até 43°C e são encontradas em solos e em infecções hospitalares
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Possuem vários flagelos polares, não produz piocianina (produz pioverdina), não cresce a 43°C. É essencialmente um microrganismo ambiental, podendo ser encontrada no solo e na água
<i>Pseudomonas marginalis</i>	Degradam pectina e são patógenos de plantas
<i>Pseudomonas putida</i>	Similares a <i>P. fluorescens</i> degrada solventes orgânicos e é utilizada em estudos envolvendo biorremediação

1.5.2. Substâncias antimicrobianas do gênero *Pseudomonas*

Já foi descrito na literatura que amostras ambientais de microrganismos do gênero *Pseudomonas* tiveram atividade antimicrobiana, abordando a importância de avaliar o potencial de amostras ambientais isoladas de diversas fontes. As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas* sp., costumam ter o espectro de ação mais restrito que as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, como por exemplo as bactérias do ácido láctico. A bacteriocina mais pesquisada de bactérias Gram-negativas são as colicinas, sintetizadas em sua maioria por estirpes de *E. coli* (Cavalcante *et al.*, 2013). Nesse caso específico, a bacteriocina é codificada por plasmídeos, possuindo três genes: o primeiro codifica a toxina, o segundo codifica uma proteína que confere imunidade específica para a célula produtora, inativando a toxina, e a terceira responsável pela liberação da colicina. A produção de colicinas tem sido relatada em situações de estresse, tanto em *E. coli*, como em outras bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, produtora de piocinas nucleases (Riley e Wertz, 2002).

A produção de bacteriocinas em estirpes de *Pseudomonas* pode estar também relacionada com a produção de moléculas sinalizadoras, provavelmente por causa da dificuldade de obter atividade no sobrenadante da cultura bacteriana. Essas moléculas sinalizadoras se difundem no meio onde se encontram as bactérias, gerando um mecanismo de comunicação célula-célula chamado “*quorum sensing*” (Laue *et al.*, 2000), que regula uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a biossíntese de antibióticos (Swift *et al.*, 1996). As estirpes de *P. aeruginosa* também estão frequentemente associadas com bacteriocinas proteínicas (ex: piocinas), agindo na degradação não específica do DNA dentro das células sensíveis, sendo essencial para a competição entre bactérias antagonistas que competem por substratos no mesmo ambiente (Parret e Mot, 2002).

Em particular, em *P. aeruginosa*, a produção de bacteriocinas do tipo piocinas foi associada a uma vantagem co-evolutiva para enfrentar a competição microbiológica durante seu crescimento e colonização no ambiente (Inglis *et al.*, 2012). Essas bacteriocinas podem estar ligadas a carboidratos ou a lipídeos (Ghequire *et al.*, 2013), possuindo ancestralidade com alguns tipos de fagos (Shinomiya e Ina, 1989).

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o surgimento de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos tem causado grande preocupação na sociedade como um todo, principalmente em ambientes hospitalares, nos quais se encontram pacientes com a imunidade fragilizada e que são os mais afetados por infecções bacterianas resistentes a antibióticos (Guimarães *et al.*, 2010). O uso de antibióticos de forma ampla contribui para o aumento de estirpes bacterianas resistentes, gerando um impacto na saúde pública e causando infecções que são difíceis de serem tratadas com antibióticos convencionais. A indústria agropecuária também é afetada de forma significativa por conta de as bactérias estarem tornando-se resistentes a antimicrobianos, pois ela utiliza em grande escala antibióticos na criação de gado e suínos (Hao *et al.*, 2014), sendo que o impacto de infecções bacterianas resistentes gera um prejuízo ao consumidor e em toda escala produtiva. Devido a todos esses fatores, a pesquisa por novas alternativas de antimicrobianos é de grande relevância. Além disso, a busca por compostos antimicrobianos tem utilidade na indústria alimentícia, pois há a necessidade de buscar novos conservantes mais naturais e eficazes contra a contaminação e crescimento de microrganismos em diversos tipos de alimentos. Um dos focos do Laboratório de Biotecnologia Sustentável e Bioinformática Microbiana (LBSBM) / Laboratório de Genética de Microrganismos Associados a Alimentos e a Indústria (LGMAI) é realizar trabalhos de bioprospecção de substâncias antimicrobianas, procurando realizar testes de caracterização genômica em estirpes de origem ambiental para pesquisar novos compostos com aplicações biotecnológicas, assim como caracterizar substâncias antimicrobianas. O gênero *Pseudomonas* já foi descrito várias vezes na literatura como um gênero rico em produção de substâncias antimicrobianas (Riley, 1998), possuindo variedade metabólica e de distribuição abrangente, sendo um ótimo ponto de partida para trabalhos de bioprospecção, podendo identificar novas substâncias antimicrobianas produzidas por *Pseudomonas* spp. que inibam o crescimento de estirpes bacterianas clínicas resistentes a antibióticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Investigar a atividade antimicrobiana de bactérias psicrotolerantes e termotolerantes isoladas da região Antártica para futuramente avaliar seu potencial uso na indústria.

3.2. Objetivos secundários

Investigar se há atividade antimicrobiana no sobrenadante das culturas psicrotolerantes, além de avaliar se ocorre a presença de halos de inibição na presença de NaOH e de protease.

Realizar a extração do material genético das estirpes psicrotolerantes que apresentam resultados de maior interesse para futuramente sequenciar e analisar o genoma completo destas, em busca de genes relacionados com a produção de bacteriocinas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de estirpes

4.1.1 Seleção das estirpes psicotolerantes e termotolerantes

As amostras bacterianas que foram testadas para verificar a produção de substâncias antimicrobianas foram cedidas pelo Professor Colaborador Alexandre Rosado, responsável pelo Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM), cuja equipe foi responsável pela coleta, isolamento e caracterização das amostras psicotolerantes (no verão, durante o período de 2006-2007) e termotolerantes (no verão, durante o período de 2015-2016) da Antártica. A identificação das amostras psicotolerantes e termotolerantes foi realizada pelo LEMM através do gene que codifica o rRNA 16S, utilizando o kit WizardGenomic®.

Nesse trabalho, selecionamos dois grupos de microrganismos extremófilos: os microrganismos termotolerantes e os psicotolerantes. No grupo das psicotolerantes, foram selecionadas 88 bactérias de diferentes gêneros, sendo 5 do gênero *Acinetobacter* spp., 17 do gênero *Arthrobacter* spp., 5 do gênero *Hafnia* spp., 1 do gênero *Planococcus* sp., 6 do gênero *Psychrobacter* spp. (Tabela 6) e 54 amostras do gênero *Pseudomonas* spp. (Tabela 7), pois este último gênero têm relatos na literatura sobre estirpes produtoras de bacteriocinas. As amostras psicotolerantes foram isoladas da King George Island, no sul das ilhas Shetland, na Antártica, durante o verão de 2006 e 2007 na Expedição Antártica de Pesquisa do Brasil (Silva *et al.*, 2017), sendo coletadas amostras de solo de diferentes locais (Figura 7). A temperatura na Baía Admiralty no verão varia de -3°C a 8°C, havendo áreas com geleiras e áreas livres de gelo na costa.

Já para o grupo dos microrganismos termotolerantes, foram selecionados 24 microrganismos isolados da Ilha Deception, durante o verão de 2015 e 2016, onde há a presença de vulcões com emissões fumarólicas diárias, águas termais e solos quentes (Schultz, 2016). O clima da ilha é caracterizado como marítimo polar, com temperatura média anual de -3°C e locais próximos a fumarolas (Figura 8), onde ocorre atividade vulcânica e há a presença de temperaturas elevadas que chegam até 150°C (Kusakabe *et al.*, 2009). As coletas foram realizadas em 2 sítios geotérmicos: Whalers bay e Fumarole Bay (Tabela 8), ambas localizadas na Ilha Deception (Figura 9).

Tabela 6 – Lista das bactérias psicrotolerantes de diferentes gêneros, isoladas da Ilha King George na região Antártica, que foram selecionadas para a realização dos testes de produção de substância antimicrobiana. Retirado da coleção do LEMM.

Nº da amostra	Espécie (NCBI)	Número de bases analisadas	Identidade (%)	Local de coleta
3	<i>Planococcus kocurii</i> strain ATCC 43650, complete genome	1429	99	Pinguineira
5	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> NR_104702.1	1418	99	Pinguineira
35	<i>Arthrobacter cryoconiti</i> NR_108846.1	1457	99	Pinguineira
44	<i>Psychrobacter fozii</i> KF054907.1	1409	99	Pinguineira
59	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> NR104702.1	1382	99	Pinguineira
65	<i>Arthrobacter</i> sp. JF799961.1	1127	98	Pinguineira
78	<i>Arthrobacter antarcticus</i> KF923437.1	1383	99	Musgo
82	<i>Arthrobacter ramosus</i> AM040214.1	1380	99	Solo amarelo
87	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> JQ923443.1	1381	99	Solo amarelo
88	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> KF254611.1	1383	99	Solo amarelo
91	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> JQ923443.1	1382	99	Solo amarelo
92	<i>Acinetobacter pittii</i> KF817678.1	1380	99	Solo amarelo
95	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> KC900372.1	1381	99	Solo amarelo
100	<i>Arthrobacter sulfureus</i> KF923457.1	1407	99	Pinguineira
107	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> AF134180.1	772	99	Musgo
111	<i>Arthrobacter</i> sp. JF728952.1	1391	98	Colobanthus
122	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> JX429031.1	1330	99	Deschampsia
123	<i>Arthrobacter sulfureus</i> KF923457.1	1232	99	Deschampsia
124	<i>Psychrobacter frigidicola</i> / KF712923.1	1467	97	Musgo
143	<i>Psychrobacter urativorans</i> NR_042221.1	1454	99	Colobanthus
152	<i>Hafnia</i> sp. JF313002.1	1330	99	Pinguineira

(Continua)

Nº da amostra	Espécie (NCBI)	Número de bases analisadas	Identidade (%)	Local de coleta
153	<i>Hafnia sp.</i> HC4-16 16S JF313002.1	1330	98	Pinguineira
166	<i>Arthrobacter sp.</i> AM419018.1	1318	100	Colobanthus
167	<i>Hafnia sp.</i> HC4-16JF313002.1	1412	98	Pinguineira
173	<i>Arthrobacter cryoconiti</i> NR_108846.1	1365	99	Musgo
186	<i>Hafnia sp.</i> HC4-16 16S JF313002.1	1384	99	Pinguineira
257	<i>Psychrobacter arcticus</i> NR_075054.1	1391	99	Deschampsia
258	<i>Hafnia sp.</i> JF313002.1	1393	99	Deschampsia
264	<i>Psychrobacter arcticus</i> NR_075054.1	1271	99	Deschampsia
306	<i>Psychrobacter glacincola</i> NR_042076.1	1433	99	Deschampsia
309	<i>Arthrobacter cryoconiti</i> NR_108846.1	1430	99	Deschampsia
311	<i>Arthrobacter cryoconiti</i> NR_108846.1	1431	99	Deschampsia
314	<i>Arthrobacter alpinus</i> AB920567.1	1274	99	Colobanthus
319	<i>Arthrobacter cryoconiti</i> NR_108846.1	1425	99	Colobanthus

Tabela 7 – Lista das amostras de *Pseudomonas* spp. psicrotolerantes, isoladas da Ilha King George na região Antártica, que foram selecionadas para a realização dos testes de produção de substância antimicrobiana. Retirado da coleção do LEMM.

Nº da amostra	Espécie (NCBI)	Número de bases analisadas	Identidade (%)	Local de coleta
1	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1463	100	Pinguineira
11	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1379	99	Pinguineira
30	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1384	99	Pinguineira
31	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain KOPRI/25673 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1340	99	Pinguineira
36	<i>Pseudomonas meridiana</i> KF528725.1	1374	99	Pinguineira
39	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DQ207731.2	1392	98	Pinguineira
40	<i>Pseudomonas fluorescens</i> HQ589333.1	1363	99	Pinguineira
42	<i>Pseudomonas salomonii</i> HG424436.1	1381	99	Pinguineira
43	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DQ207731.2	1379	99	Pinguineira
46	<i>Pseudomonas monteilii</i> KF475867.1	1406	99	Deschampsia
47	<i>Pseudomonas antarctica</i> NR_025586.1	1392	99	Deschampsia
50	<i>Pseudomonas putida</i> strain C14/16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1451	99	Colobanthus
58	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1385	99	Pinguineira
62	<i>Pseudomonas meridiana</i> NR_025587.1	1398	99	Pinguineira
64	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1390	99	Pinguineira
67	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1414	99	Pinguineira
101	<i>Pseudomonas antarctica</i> HE586386.1	1403	99	Musgo
118	<i>Pseudomonas panacis</i> KF501476.1	1405	99	Deschampsia
141	<i>Pseudomonas panacis</i> KF501476.1	1464	98	Colobanthus
145	<i>Pseudomonas antarctica</i> FM955872.1	1464	99	Musgo
157	<i>Pseudomonas</i> sp. KJF11-6 16S JQ800176.1	1466	99	Pinguineira

(Continua)

Nº da amostra	Espécie (NCBI)	Número de bases analisadas	Identidade (%)	Local de coleta
160	<i>Pseudomonas lini</i> AB649011.1	1467	99	Pinguineira
176	<i>Pseudomonas antarctica</i> FM955872.1	1389	99	Musgo
181	<i>Pseudomonas lini</i> DQ377769.1	1364	99	Colobanthus
187	<i>Pseudomonas monteilii</i> KF475867.1	1390	99	Colobanthus
191	<i>Pseudomonas fluorescens</i> JQ336977.1	1185	99	Musgo
216	<i>Pseudomonas lini</i> AB649011.1	1407	99	Colobanthus
226	<i>Pseudomonas sp.</i> TP-Snow-C84 KC987014.1	1355	99	Colobanthus
230	<i>Pseudomonas sp.</i> HC2-25 JF312964.1	1398	99	Pinguineira
244	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ999933.1	1387	99	Colobanthus
252	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ999933.1	1393	99	Colobanthus
273	<i>Pseudomonas salomonii</i> JX840381.1	1364	99	Deschampsia
277	<i>Pseudomonas sp.</i> PAMC 26818 16S ribosomal RNA gene, p. sequence	1381	99	Deschampsia
280	<i>Pseudomonas sp.</i> PAMC 26818/KF011692.1	1437	99	Deschampsia
290	<i>Pseudomonas brenneri</i> KC462972.1	693	99	Colobanthus
291	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ179366.1	1479	99	Colobanthus
294	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ999933.1	1136	99	Colobanthus
295	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ179366.1	1399	99	Deschampsia
296	<i>Pseudomonas poae</i> strain IHBB 9211 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1468	100	Colobanthus
297	<i>Pseudomonas trivialis</i> JN377670.1	1399	99	Pinguineira
298	<i>Pseudomonas trivialis</i> JN377670.1	1412	99	Pinguineira
299	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ179366.1	1470	99	Pinguineira

(Continua)

Nº da amostra	Espécie (NCBI)	Número de bases analisadas	Identidade (%)	Local de coleta
301	<i>Pseudomonas trivialis</i> FJ179366.1	1459	99	Pinguineira
302	<i>Pseudomonas panacis</i> KF501476.1	1374	99	Deschampsia
303	<i>Pseudomonas poae</i> JQ782898.1	1421	99	Deschampsia
321	<i>Pseudomonas antarctica</i> FM955872.1	1417	99	Pinguineira
323	<i>Pseudomonas antarctica</i> FM955872.1	1448	99	Colobanthus
324	<i>Pseudomonas antarctica</i> FM955872.1	1460	99	Colobanthus
325	<i>Pseudomonas brenneri</i> JX417436.1	1451	99	Colobanthus
328	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> KF704095.1	394	97	Pinguineira
329	<i>Pseudomonas antarctica</i> FM955872.1	1405	99	Pinguineira
331	<i>Pseudomonas sp.</i> HC4-5 16S JF312992.1	1462	99	Pinguineira
332	<i>Pseudomonas poae</i> JQ782898.1	1407	99	Pinguineira
333	<i>Pseudomonas fluorescens</i> JF327445.1	876	99	Solo amarelo

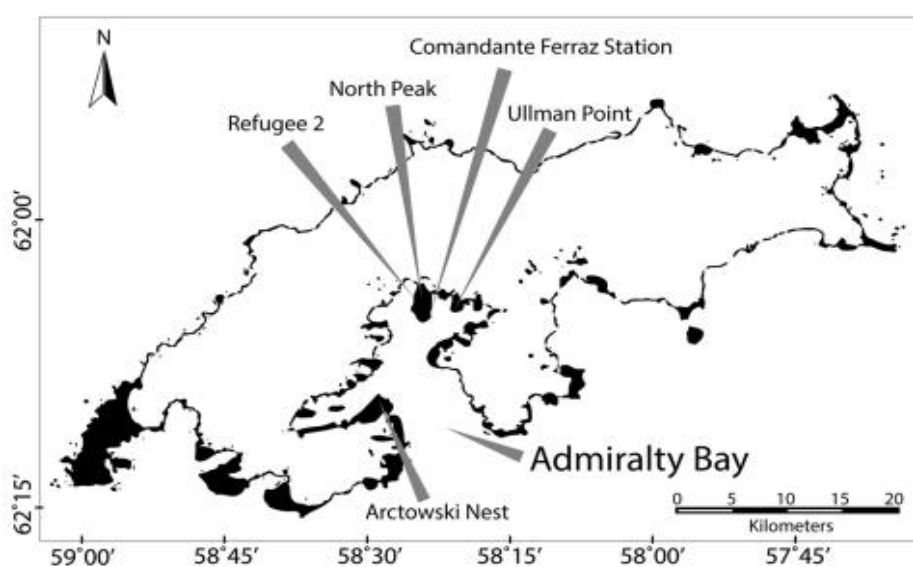


Figura 7 – Mapa do arquipélago de Shetland na Antártica. As setas indicam os locais de onde as amostras foram coletadas. (Silva *et al.*, 2017).

Tabela 8 – Lista das bactérias termotolerantes, isoladas da Ilha Deception na região Antártica, que foram selecionadas para a realização dos testes de produção de substância antimicrobiana. Retirado da coleção do LEMM.

Nº da amostra	Local de coleta
79	Fumarole Bay (FB4)
94	Fumarole Bay (FB4)
105	Fumarole Bay (FB4)
126	Fumarole Bay (FB2)
133	Fumarole Bay (FB4)
148	Fumarole Bay (FB4)
150	Fumarole Bay (FB4)
157	Fumarole Bay (FB4)
159	Fumarole Bay (FB4)
160	Fumarole Bay (FB4)
175	Whalers Bay (WB1)
185	Whalers Bay (WB1)
208	Fumarole Bay (FB2)
233	Whalers Bay (WB1)
118	Fumarole Bay (FB1)
203	Fumarole Bay (FB1)
225	Fumarole Bay (FB3)
76	Fumarole Bay (FB4)
77	Fumarole Bay (FB4)
82	Fumarole Bay (FB4)
87	Fumarole Bay (FB4)
202	Fumarole Bay (FB4)
204	Fumarole Bay (FB4)
223	Fumarole Bay (FB6)



Figura 8 – (a) Imagem das construções que foram utilizadas na exploração baleeira em Whalers Bay; (b) Fumarolas emitindo gases em Fumarole Bay, local de coleta das amostras termotolerantes. Foto do acervo pessoal de Yuri Pinheiro (2016).

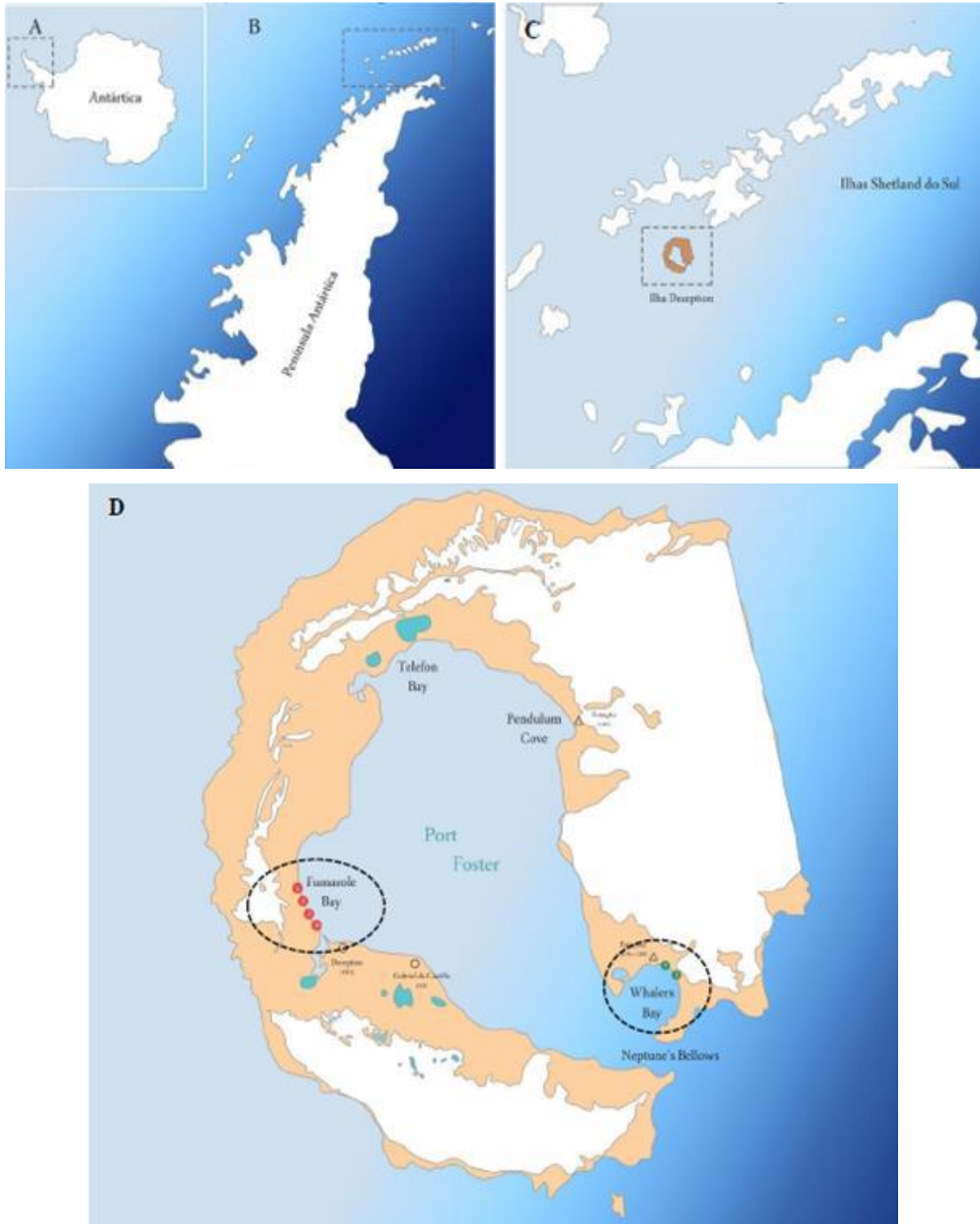


Figura 9 – Esquema do continente antártico. (A) Península Antártica; (B) Ilhas Shetland do Sul; (C) Ilha Deception; (D) Pontos de amostragem na Ilha Deception. Imagem do acervo pessoal da Júnia Schultz (2016).

4.1.2 Seleção das estirpes bacterianas indicadoras

Foram selecionadas 26 estirpes bacterianas para serem indicadoras no teste de antagonismo, variando entre estirpes ATCC, estirpes sem resistência a antimicrobianos, estirpes com resistência a antimicrobianos e estirpes isoladas de pacientes imunodeficientes (Tabela 9). Essas estirpes foram obtidas em laboratórios parceiros no Instituto de Microbiologia: o Laboratório de Infecção Hospitalar, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica. O teste de antagonismo foi realizado através de duas metodologias diferentes, ambas em triplicata.

Tabela 9 – Espécies bacterianas usadas como indicadores no teste de antagonismo.

Origem das estirpes	Espécies
Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (Profª. Beatriz Meurer Moreira)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC*
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL**
	<i>Enterobacter cloacae</i> NDM-1***
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SPM****
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> não produtora de SPM
	<i>Acinetobacter baumannii</i> não produtora de OXA-23*****
	<i>Escherichia coli</i> ESBL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 ESBL
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15422
Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Prof. Marcos Miguel)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
	<i>Micrococcus</i> sp.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 19ae
	<i>Staphylococcus aureus</i> HIV 86 ^a
Laboratório de Infecção Hospitalar (Profª. Kátia Regina Santos)	<i>Staphylococcus aureus</i> HIV 87 ^a

(Continua)

Origem das estirpes	Espécies
Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (Profa. Beatriz Meurer Moreira)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 1 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 7 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 8 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1181604 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1183182 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1192079 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5142169 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 514471 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 528412 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 822156-1 KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Uo4 KPC

* KPC: *Klebsiella* produtora de carbapenemase

** ESBL: Produtora de β -lactamases de espectro estendido

*** NDM-1: Produtora de Nova Delhi metallo- β -lactamase

**** SPM: *Pseudomonas* produtora de metallo- β -lactamase

***** OXA-23: Resistência a carbapenemas mediada por OXA-23

4.2 Teste de antagonismo para avaliar a atividade antimicrobiana

4.2.1 Teste de antagonismo com método de poços em placas de LB sólido

Para se verificar a produção de substância antimicrobiana em cultura bacteriana inoculada em meio líquido, foram utilizadas placas de LB sólido (Anexo I) para cada bactéria indicadora, em triplicata. As amostras psicrotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm, enquanto as amostras termotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 60°C por 48h com agitação a 120 rpm, para promover maior aeração. As amostras clínicas indicadoras foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 38°C por 24h, sem agitação. Após o crescimento, foram adicionados 50 µL da amostra indicadora em 5 mL de semissólido 1% ágar nutriente (Anexo II), em estado líquido pré-aquecido, vertendo diretamente na placa de LB sólido, formando um tapete homogêneo sobre a placa de LB sólido (Anexo I). Após a solidificação do semissólido, foram realizados poços nas placas (Figura 10) e então adicionados 50 µL de cada amostra psicrotolerante e termotolerante, em poços separados para cada amostra. Após a secagem dos poços, as placas foram incubadas a 28°C, no caso das amostras psicrotolerantes, e a 38°C, no caso das amostras termotolerantes, para que as amostras indicadoras crescessem no tapete de semissólido. Após 24h, foi realizada a leitura dos resultados para observar a presença ou ausência de halos de inibição nas amostras com resultado positivo (Vanden e Vlietinck, 1991).

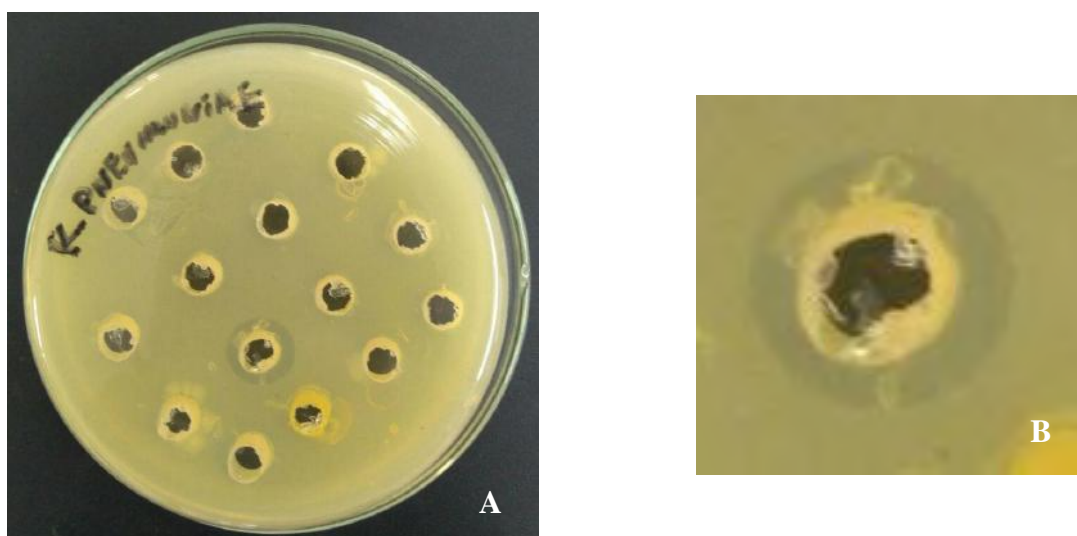


Figura 10 – Foto do método com poços em placas. (A) Cada placa de meio LB sólido (Anexo I) comporta até 15 poços. (B) Halo de inibição, indicando que não houve crescimento da amostra indicadora ao redor do poço.

4.2.2 Teste de antagonismo com método com vapor de clorofórmio

Para aplicar esse método, as amostras psicotolerantes foram cultivadas em 5 mL de caldo LB (Anexo I) a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm, enquanto as amostras termotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 60°C por 48h com agitação a 120 rpm. Após o crescimento das amostras psicotolerantes e termotolerantes, foram adicionados 2 µL de cada amostra em placas de LB sólido (Anexo I), formando spots. As placas contendo as bactérias psicotolerantes foram incubadas a 28°C, enquanto as placas contendo as bactérias termotolerantes foram incubadas a 60°C. As amostras clínicas indicadoras foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 38°C por 24h, sem agitação. Após o crescimento dos spots, as placas foram tratadas com 1 mL de clorofórmio, aplicado em algodão na tampa da placa de petri, por 30 minutos, para matar as bactérias (Figura 11). Em seguida, as placas foram deixadas abertas no fluxo para evaporar o clorofórmio, durante 10 minutos, ou fechadas na bancada por 1 hora. Depois de ter evaporado o clorofórmio, foram adicionados 50 µL da amostra indicadora em 5 mL de semissólido 1% ágar nutriente (Anexo II), em estado pré-aquecido, vertendo diretamente na placa de LB sólido, formando um tapete homogêneo. As placas foram incubadas a 28°C, no caso das amostras psicotolerantes, e a 38°C, no caso das amostras termotolerantes, para que as amostras indicadoras crescessem no tapete de semissólido. Após 24h, foi realizada a leitura dos resultados para observar a presença de halos de inibição nas amostras com resultados positivos (Giambiagi-Demarval *et al.*, 1990).



Figura 11 – Foto detalhando o método com vapor de clorofórmio.

4.2.3 Indução de bactéria lisogênica por UV

As amostras psicrotolerantes que tiveram resultado positivo no teste de antagonismo foram utilizadas neste teste. Para isso, as amostras psicrotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 24h, a 80 rpm. Após 24h, foram adicionados 5 mL das culturas bacterianas em 10 mL de LB líquido (Anexo I), obtendo uma leitura de densidade ótica de 0,2 DO₆₀₀. Depois, as amostras foram incubadas a 28°C, com agitação a 80 rpm, até obter uma leitura de 0,5 DO₆₀₀. Após chegar a 0,5 DO₆₀₀, as amostras foram centrifugadas a 12.100 xg, por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, os sedimentos foram dissolvidos em 10 mL de tampão para fagos (Anexo III), distribuindo as suspensões bacterianas em placas de Petri estéreis (5 mL em cada placa). Depois, as placas foram irradiadas com luz UV (dose de 250 a 300 ergs/cm²). As suspensões foram recolhidas e adicionadas em um erlenmeyer com 10 mL de LB líquido (Anexo I), incubadas no escuro a 28°C, com agitação a 80 rpm por 2 horas, para obter a lise celular e a liberação dos fagos. Os lisados foram filtrados utilizando seringas estéreis e membranas de filtração 0,22 µm (Biofil®) e foram aplicados 10 µL em uma placa de LB sólido (Anexo I), contendo um tapete com uma amostra indicadora clínica semeada com o auxílio da alça *Drigalski*. A amostra indicadora clínica utilizada neste teste foi previamente cultivada a 38°C por 24h em 5 mL de LB líquido (Anexo I). Após 24h, foi realizada a leitura dos resultados para observar a presença de áreas de lise (Figura 12) (Bastos e Penido, 1981).

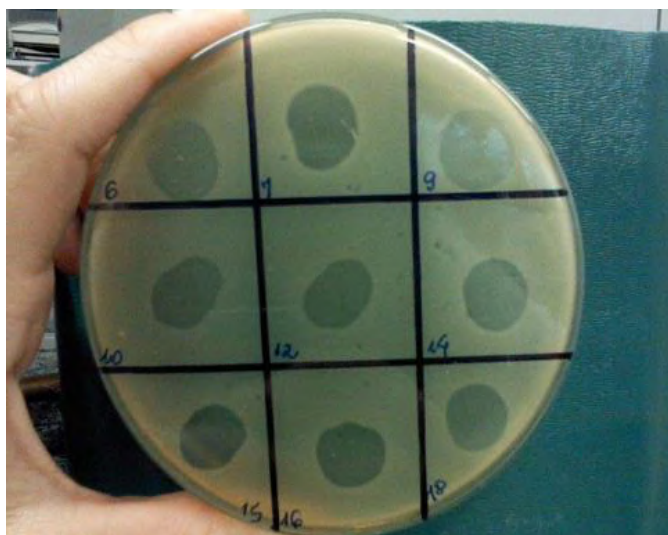


Figura 12 – Área de lise típica, utilizando diferentes bacteriófagos. Retirado de Rezende, A.C.V. (2010).

4.3 Isolamento e concentração das substâncias antimicrobianas

4.3.1 Método com centrifugação e aplicação do sobrenadante

Para investigar se as substâncias antimicrobianas das amostras psicotolerantes são secretadas para o meio extracelular, foi aplicada esta metodologia. As amostras psicotolerantes que tiveram resultado positivo nos testes de antagonismo foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm. Após o crescimento das amostras, foram centrifugados 1,5 mL de cada cultura bacteriana a 15.288 xg por 10 minutos, para a precipitação das células bacterianas. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado utilizando uma seringa estéril e membrana de filtração 0,22 µm (Biofil®). Foram realizados testes de antagonismo utilizando o sobrenadante filtrado, com a metodologia com poços em placas, aplicando 50 µL de cada sobrenadante filtrado em seus determinados poços nas placas de LB sólido (Anexo I), com o tapete da bactéria indicadora vertida anteriormente no meio semissólido 1% ágar nutriente (Anexo II). As placas foram incubadas a 28°C por 24h, em triplicatas. Foi utilizado um poço com uma amostra psicotolerante, como controle positivo do halo de inibição, e um poço contendo somente meio de cultura, como controle negativo. Após 24h foi realizada a leitura dos resultados.

4.3.2 Método de lise celular por ação de detergentes

Além de verificar se há atividade antimicrobiana no sobrenadante das amostras psicotolerantes, com as bactérias que tiveram resultado positivo no teste de antagonismo também foi aplicada essa metodologia para ver se ocorre inibição quando a célula bacteriana é lisada, utilizando detergentes. Para isso, foram utilizados quatro diferentes detergentes, em diferentes concentrações (Tabela 10), diluídos em meio LB líquido (Anexo I). As amostras psicotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm. Depois, foi aplicada a metodologia com poços em placas, havendo quatro disposições distintas para a aplicação em cada poço (A, B, C e D), utilizando todos os detergentes em suas respectivas concentrações e as amostras bacterianas testadas:

- A) Para realizar a aplicação do primeiro poço, 750 μL de detergente e 750 μL de cultura bacteriana foram misturados a 28°C por 30 minutos, a 80 rpm. Depois, o material foi centrifugado a 15.288 xg por 10 minutos. Após a centrifugação, 50 μL do sobrenadante foram aplicados no poço, em triplicatas para cada amostra e detergente.
- B) Para realizar a aplicação do segundo poço, foram centrifugados 1,5 mL da amostra a 15.288 xg, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi homogeneizado com 1 mL de detergente, depois aplicados 50 μL no poço. Essa metodologia foi realizada em triplicatas para cada amostra e detergente.
- C) No terceiro poço, foram aplicados 50 μL da cultura bacteriana sem centrifugação, como controle positivo do halo de inibição. Foram empregados poços distintos para cada amostra.
- D) No quarto poço, foram aplicados 50 μL do detergente, para verificar se a inibição ocorre por causa da presença do detergente. Foram empregados poços distintos para cada detergente.

Após a aplicação dos devidos conteúdos nos poços, as placas de LB sólido (Anexo I) foram incubadas a 28°C por 24h. Após 24h, foi realizada a leitura dos resultados.

Tabela 10 – Lista dos detergentes utilizados nos testes.

Lista dos detergentes	Concentração
Tween 20	0,1%
SDS	0,05%
SDS	0,1%
Triton x-100	0,05%
Triton x-100	0,1%
CTAB	0,01%

4.3.3 Método de lise celular por FastPrep

Nessa metodologia, verificamos se ocorria a presença de halo de inibição após a lise mecânica nas amostras psicotolerantes que tiveram resultado positivo no teste de antagonismo. Para isso, as amostras psicotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm. Depois, as amostras ficaram 40 segundos na velocidade 6 do FastPrep (FP 120, Thermo®) em microtubos contendo 0,4 g de pérolas de vidro. Após a lise, as amostras foram filtradas utilizando uma seringa estéril e membrana de filtração 0,22 µm (Biofil®). Foi utilizada a metodologia com poços em placas, em triplicatas, sendo o primeiro poço com a cultura bacteriana de cada amostra como o controle positivo do halo de inibição, o segundo poço contendo a amostra após a lise, sem filtração, e o terceiro poço com a amostra após a lise, com filtração. As placas foram incubadas a 28°C após a secagem dos poços, avaliando-se o resultado após 24h.

4.3.4 Método de concentração e obtenção do extrato bruto por Speed Vac

Uma das metodologias utilizadas para concentrar o sobrenadante das amostras psicotolerantes foi a utilização do Speed Vac. As amostras psicotolerantes foram inoculadas em 50 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.100 xg, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados utilizando seringas estéreis e membranas de filtração 0,22 µm (Biofil®). Após a filtração, 1 mL de cada sobrenadante foi seco utilizando o Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf®, Alemanha), por 4 horas. O extrato bruto foi suspenso em 50 µL de solução salina 0,85%, concentrando 20 vezes o sobrenadante. Após a obtenção do extrato concentrado, foi aplicada a metodologia com poços em placas de LB sólido (Anexo I). Foram realizados também poços com os controles positivos, com a cultura bacteriana pura de cada amostra, e poços com o controle negativo, com solução salina 0,85%. Essa metodologia foi aplicada em duplicata para cada estirpe psicotolerante que teve resultado positivo no teste de antagonismo (Glatthardt, T.S.S., 2016).

4.3.5 Método de concentração por liofilização

Para concentrar a substância antimicrobiana das amostras psicrotolerantes que tiveram resultado positivo no teste de antagonismo, também foram realizadas liofilizações dos sobrenadantes das amostras. Para isso, foram preparados os pré-inóculos das amostras psicrotolerantes em 50 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 24h, com agitação a 80 rpm. Em seguida, os pré-inóculos foram adicionados a 200 mL de LB líquido (Anexo I) e mantidos sob agitação a 80 rpm, a 28°C, por 24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 15.300 xg por 30 minutos e transferidas para um novo tubo, onde foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após as duas centrifugações, as amostras foram distribuídas em alíquotas de 25 mL para serem congeladas a -90°C e depois liofilizadas, durante 120 horas (Figura 13). Após a liofilização, 10 alíquotas foram ressuspensas em 5 mL de LB líquido (Anexo I), enquanto outras 10 alíquotas foram ressuspensas em 5 mL de tampão fosfato (pH 6,8). Foram realizados testes de antagonismo com a metodologia com poços em placas de LB sólido (Anexo I) para avaliar se havia presença de halos de inibição, utilizando como controle um poço com a cultura bacteriana de cada amostra, em triplicata. As placas foram incubadas a 28°C após a secagem dos poços, avaliando-se o resultado após 24h. Adaptado de Silva (2003).



Figura 13 – Procedimento de liofilização. O liofilizador na foto é o K120, da marca Liotop®.

4.3.6 Adição de NaOH e protease para verificar a natureza química das substâncias antimicrobianas

Essa metodologia foi utilizada para verificar se as substâncias antimicrobianas são ácidos orgânicos ou peptídeos antimicrobianos com interesse industrial. Dessa forma, neutralizamos os possíveis ácidos produzidos pelas estirpes psicrotolerantes e verificamos se ainda havia atividade antimicrobiana mesmo na presença de protease. Para todas as análises a seguir, as amostras psicrotolerantes foram inoculadas em 5 mL de LB líquido (Anexo I) a 28°C por 48h, em agitação a 80 rpm, utilizando a metodologia com poços em placas para verificar a produção de substância antimicrobiana. Para verificar a atividade do NaOH, a cultura bacteriana foi misturada com o NaOH 0,1N na proporção de 1:1 e 50 µL foram aplicados em cada poço. Para verificar a atividade da protease, a cultura bacteriana foi misturada com a protease 5 mg/mL (Sigma®) de *Streptomyces griseus* na proporção de 1:1 e 50 µL foram aplicados em cada poço. Para este experimento, o controle positivo utilizado foi a cultura bacteriana de cada amostra, enquanto que o controle negativo utilizado foi a protease 5 mg/mL (Sigma®) e o NaOH 0,1N. O experimento foi realizado em triplicata.

Além disso, essa mesma metodologia foi utilizada com os sobrenadantes das amostras, que foram obtidos após uma centrifugação de 1,5 mL de cultura bacteriana a 15.288 xg, por 10 minutos. Todos os testes de antagonismos foram realizados utilizando placas de LB sólido (Anexo I) (Giambiagi-de-Marval *et al.*, 1990; Silva, 2003).

4.4 Caracterização inicial da produção das substâncias antimicrobianas

4.4.1 Ação do tempo de crescimento sobre a atividade antimicrobiana

Para verificar o melhor tempo de crescimento das amostras psicotolerantes que tiveram resultados positivos no teste de antagonismo, foram realizados diferentes crescimentos em tubos de rosca com 5 mL de LB líquido (Anexo I). Para realizar o teste de antagonismo, as amostras foram incubadas em diferentes intervalos de tempo (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h e 192h), totalizando um intervalo de 8 dias, a 28°C com agitação a 80 rpm. Após o teste de antagonismo, as placas foram incubadas a 28°C, avaliando o resultado após 24h.

4.4.2 Ação da mudança de pH do meio sobre a atividade antimicrobiana

Para verificar o melhor pH para o crescimento das amostras psicotolerantes que tiveram resultados positivos no teste de antagonismo, foram utilizados diferentes meios de LB líquidos (Anexo I), com o pH variando entre 6, 6.5, 7, 7.5. As amostras foram incubadas, nesses quatro diferentes pHs, a 28°C por 48h, com agitação a 80 rpm. Após o crescimento, foram realizados testes de antagonismo utilizando a metodologia com poços em placas, com um poço para cada amostra de cada meio de cultura com o pH diferente, além de um poço controle, com as amostras crescidas no meio LB líquido (Anexo I) em pH 7,2.

4.5 Extração de DNA para sequenciamento das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas

4.5.1 Método rápido de extração de DNA cromossômico

O DNA das amostras termotolerantes que tiveram resultados considerados promissores nos testes de antagonismo foi extraído utilizando o kit da Promega WizardGenomic®, enquanto o DNA das amostras psicrotolerantes que tiveram resultados promissores nos testes de antagonismo foi extraído de acordo com o protocolo modificado de Ausubel *et al.* (1997). Para este fim, foi adicionado 1 mL do pré-inóculo das bactérias psicrotolerantes em 20 mL de meio LB líquido (Anexo I), a 28°C por 24h, em agitação a 80 rpm. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.100 xg, por 10 minutos. Os pellets das amostras foram ressuspensos em 6 mL de tampão TRIS 50Mm (BioAgengy®) e EDTA 50Mm (Reagen®), em 6 tubos (para cada amostra), sendo 1 mL de tampão em cada. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 12.100 xg, por 10 minutos e então ressuspensas em 450 µL do mesmo tampão, adicionando 25 µL de lisozima 0,5 mg/mL (Sigma®) e 10 µL de RNase 200 µg (Sigma®), incubando as amostras a 37°C por duas horas, em banho-maria.

Após duas horas, foram adicionados 15 µL de SDS 20% (Lauril Sulfato de Sódio, Isofar®) e incubado novamente a 37°C, por uma hora. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de NaCl na concentração de 5M e 80 µL de solução CTAB/NaCl (Anexo IV), incubado a 65°C, por 10 minutos. Depois, foram adicionados 1:2 volumes de clorofórmio/álcool isoamílico (Isofar®) (proporção 24:1), homogeneizado por 15 minutos. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 22.932 xg, e os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos. Esse processo foi repetido duas vezes para purificar o DNA das amostras.

A seguir, os sobrenadantes foram divididos em volumes iguais de 400 μ L e então adicionado 2,5 volumes de etanol absoluto (Isofar®), totalizando 1,4 mL de solução contendo o DNA das amostras. As amostras foram incubadas a -20°C por 24h e, após esse período, foram centrifugadas a 22.932 xg por 30 minutos, a 4°C , desprezado o sobrenadante e deixando secar no fluxo laminar os pellets com o DNA das amostras. Depois foram adicionados 50 μ L de etanol 80% (Isofar®) nas amostras, centrifugando novamente a 22.932 xg por três minutos, a 4°C , desprezando o sobrenadante logo em seguida e ressuspensando em água deionizada ultrapura (Milli-Q®), deixando a 15°C por 24 horas. Após o tempo de incubação, o DNA das amostras foram ressuspensados para que o conteúdo de todos os tubos no final fique somente em dois tubos, com o DNA extraído.

4.5.2 Eletroforese

Foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1% (Tedia Brazil®) a 80V por duas horas em tampão TBE (Anexo V) (Sambrook *et al.*, 1989) para analisar o DNA das amostras psicotolerantes, verificando a integridade do DNA. Para isso, foi utilizado o padrão molecular de 1kb Ladder (Invitrogen®) e três diluições seriadas deste.

4.5.3 Quantificação de DNA

A quantificação do DNA das amostras psicotolerantes foi realizada pelo equipamento Qubit® dsDNA HS (high sensitivity), de acordo com as recomendações do fabricante. O Qubit® é um método preciso de quantificação de DNA, baseado no uso de sondas fluorescentes. Também foi avaliada a qualidade da extração do DNA utilizando o equipamento NanoDrop (Thermo Fisher®), devido ao fato destas amostras terem o DNA extraído sem a utilização de kit de purificação, sendo possível avaliar os níveis de impureza no DNA em solução de água deionizada ultrapura (Milli-Q®).

5. RESULTADOS

5.1 Teste de antagonismo para verificar a produção de substâncias antimicrobianas

Duas amostras psicrotolerantes e duas amostras termotolerantes apresentaram halos de inibição de 5 mm contra diferentes patógenos (Tabela 11). As amostras psicrotolerantes não apresentaram halo quando realizada a metodologia com o vapor de clorofórmio, enquanto as amostras termotolerantes apresentaram halo em ambas metodologias utilizadas (Figura 14).

Tabela 11 – Resultado do teste de antagonismo. Foram utilizadas duas metodologias distintas para avaliar a presença de atividade antimicrobiana.

Nº da amostra	Amostras que tiveram halo de inibição	Patógeno inibido	Metodologia utilizada
79	<i>Geobacillus</i> sp. strain N1222 (termotolerante)	<i>Micrococcus</i> sp.	Metodologia com poços em placas e metodologia com vapor de clorofórmio
233	<i>Brevibacillus thermoruber</i> strain 423 (termotolerante)	<i>Micrococcus</i> sp.	Metodologia com poços em placas e metodologia com vapor de clorofórmio
273	<i>Pseudomonas salomonii</i> / JX840381.1 (psicrotolerante)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 19ae <i>Staphylococcus aureus</i> HIV 87a <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não produtora de SPM <i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 1 KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 8 KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1192079 KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 822156-1 KPC	Metodologia com poços em placas
280	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC 26818/ KF011692.1 (psicrotolerante)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 19ae <i>Staphylococcus aureus</i> HIV 87a <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não produtora de SPM <i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 1 KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i> Inca 8 KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1192079 KPC <i>Klebsiella pneumoniae</i> 822156-1 KPC	Metodologia com poços em placas



Figura 14 – Resultado do teste de antagonismo das amostras termotolerantes utilizando o método de vapor de clorofórmio. A amostra indicadora utilizada foi a *Micrococcus* sp..

5.2 Indução de bactéria lisogênica por UV

As estirpes psicotolerantes que apresentaram atividade inibitória contra bactérias foram selecionadas para novos testes para verificar se havia profagos ou fagos defectivos nas células bacterianas. Porém, não foi observada lise quando realizada a indução por UV, nem o aumento da atividade antimicrobiana, sugerindo que a atividade antimicrobiana não estaria ocorrendo devido à presença de profagos ou fagos defectivos nas estirpes psicotolerantes.

5.3 Isolamento e concentração das substâncias antimicrobianas

5.3.1 Método de centrifugação e aplicação do sobrenadante

Os sobrenadantes das amostras psicotolerantes, que foram devidamente filtrados para tentar isolar as substâncias antimicrobianas, não apresentaram halo de inibição, somente quando aplicada a cultura bacteriana sem filtração.

5.3.2 Método de concentração do extrato bruto por Speed Vac

Os sobrenadantes das amostras psicotolerantes foram concentrados pelo Speed Vac Concentrator Plus (*Eppendorf*®, Alemanha). Porém, foi verificada que não houve a presença de halos de inibição em ambas amostras psicotolerantes, mostrando que, mesmo concentrando o sobrenadante, este não apresenta inibição.

5.3.3 Método de Concentração por liofilização

Os sobrenadantes das amostras psicrotolerantes foram liofilizados para verificar se ocorriam halos de inibição quando concentrado o sobrenadante. Porém, foi observado que não houve halos de inibição em ambas amostras psicrotolerantes, mostrando que, mesmo concentrando o sobrenadante, este não apresenta inibição.

5.3.4 Método de lise celular por ação de detergentes

A metodologia da lise celular por ação de detergentes também não teve resultados positivos, não havendo halo de inibição quando aplicado o pellet homogeneizado com detergente e nem quando centrifugado o sobrenadante, após a homogeneização com os detergentes.

5.3.5 Método de lise celular por FastPrep

Na lise mecânica por FastPrep, só ocorreu halo quando aplicado à cultura pura sem centrifugação, ou o lisado da cultura bacteriana, indicando que possivelmente as substâncias antimicrobianas estejam relacionadas com a membrana da célula. Quando aplicado o sobrenadante filtrado, não ocorreram halos de inibição.

5.3.6 Adição de NaOH e protease para verificar a natureza química das substâncias antimicrobianas

Houve a presença de halos de inibição de 5 mm mesmo na presença de NaOH 0,1N, indicando que a natureza química não é de origem ácida, como, por exemplo, os ácidos orgânicos. A mesma coisa foi observada na presença de protease 5 mg/mL (Figura 15). Desta forma, é possível especular que a inibição pode estar sendo causada por ação uma bacteriocina resistente à protease, ou de outra substância com atividade antimicrobiana, como biossurfactantes.

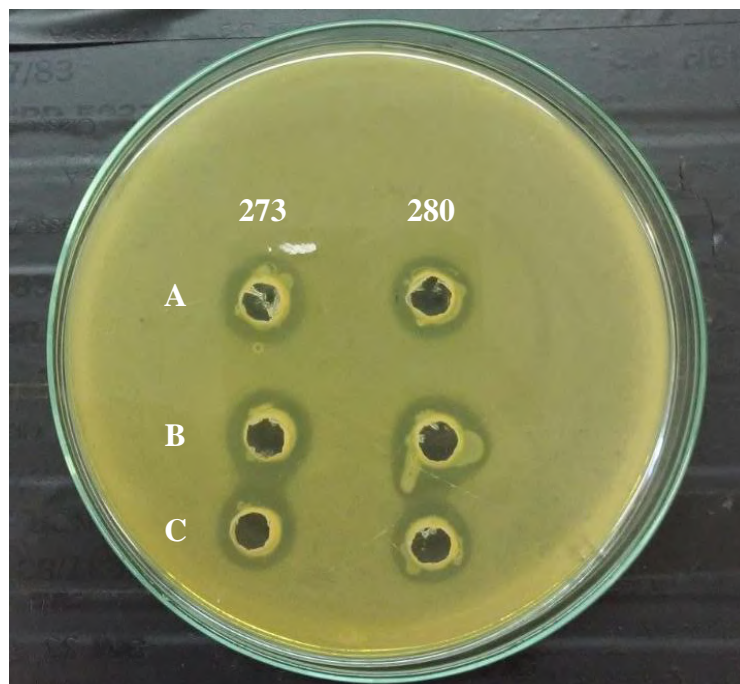


Figura 15 – Resultado do teste de antagonismo utilizando NaOH e protease. Foi utilizado com bactéria indicadora a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, junto com (A) Cultura bacteriana das bactérias psicrotolerantes produtoras de substâncias antimicrobianas, (B) Cultura bacteriana com a adição de NaOH 0,1N e (C) Cultura bacteriana e adição de protease 5 mg/mL.

5.4 Caracterização inicial da produção das substâncias antimicrobianas

Para descobrir as melhores condições de cultivo das amostras psicrotolerantes, foram realizados vários crescimentos em meio LB líquido (Anexo I) com diferentes pHs. Desta forma, para otimizar os testes, foi observado que as amostras psicrotolerantes 273 e 280 crescem melhor em pH 7 e 7,5. Além disso, as amostras psicrotolerantes apresentaram halos de inibição de 5 mm, no teste de antagonismo utilizando a metodologia com poços em placas, entre 24h até 96h. Ambas amostras apresentaram melhor crescimento quando expostas à agitação constante de 80 rpm, podendo crescer em diferentes temperaturas, que variam de 20°C até 28°C, em meio LB (Anexo I).

5.5 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras psicrotolerantes e termotolerantes foi bem-sucedida. As amostras psicrotolerantes apresentaram banda de DNA, no gel de agarose 1% (Tedia Brazil®) (Figura 16).

O equipamento Qubit® dsDNA HS (high sensitivity) avaliou que a cepa 273 teve > 600 ng/mL de DNA após a extração, enquanto a cepa 280 teve 29,6 µg/mL de DNA após a extração. Esses valores são satisfatórios, indicando que a extração de DNA foi realizada com sucesso, conseguindo uma quantidade razoável de DNA de cada amostra.

O equipamento NanoDrop (Thermo Fisher®) determinou que a cepa 273 teve 87,4 ng/µL de DNA após a extração, sendo o parâmetro de absorbância 260/280 1,88 (o ideal é 1,8) e o parâmetro de absorbância 260/230 0,93 (o ideal é 2,0). A cepa 280 teve 88,3 ng/µL após a extração, sendo o parâmetro de absorbância 260/280 1,85 (o ideal é 1,8) e o parâmetro de absorbância 260/230 0,85 (o ideal é 2,0). A qualidade do DNA de ambas as cepas se mostrou razoável, podendo ocorrer impurezas devido à presença de proteínas, fenol e/ou outros contaminantes.

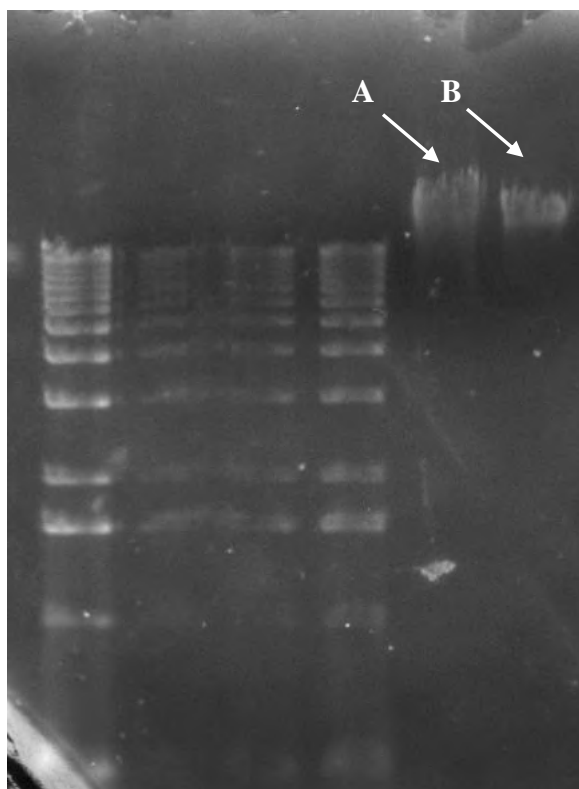


Figura 16 – Resultado da extração de DNA no gel de agarose 1% (Tedia Brazil®). (A) Amostra 273. (B) Amostra 280. As quatro bandas no lado esquerdo do gel são, respectivamente, o marcador de massa molecular de 1kb Ladder (Invitrogen®) e suas três diluições seriadas.

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho teve como objetivo principal avaliar o uso de estirpes ambientais, originalmente isoladas do ambiente antártico em condições de temperatura extrema, como uma fonte de biomoléculas com atividade antimicrobiana. A principal justificativa para este trabalho é o problema crescente que tem sido a resistência aos antimicrobianos (Richard e Tor, 2014). O uso intensivo de antibióticos gerou uma maior pressão seletiva nos microrganismos, resultando no surgimento de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos (Neu, 1992). Neste trabalho, quatro amostras extremófilas de temperatura apresentaram inibição contra diferentes patógenos, sendo alguns resistentes a antibióticos. De acordo com Nair e Simidu (1987) e Grossart e colaboradores (2003), essa inibição pode ocorrer devido a uma estratégia desenvolvida por estes microrganismos, isolados de ambientes extremos com baixa disponibilidade de nutrientes, para competir pela colonização e absorção de nutrientes com outras espécies bacterianas. Desta forma, é sugerido que os microrganismos deste estudo podem produzir metabólitos bioativos.

Através dos testes de antagonismo das bactérias termotolerantes, detectou-se que as cepas 79 e 233, pertencentes respectivamente aos gêneros *Geobacillus* e *Brevibacillus*, possuem atividade antimicrobiana contra uma estirpe de *Micrococcus* sp.. Pokusaeva e colaboradores (2009) observaram que as bacteriocinas produzidas por *Geobacillus stearothermophilus* foram capazes de inibir outras estirpes de *Geobacillus* spp., como, por exemplo, as espécies *G. thermodenitrificans* e *G. stearothermophilus*. Em outro artigo, de Chawawisit e colaboradores (2008), os autores mostram que a estirpe SA14 de *Brevibacillus laterosporus* produziu metabólitos secundários (compostos bioativos) que inibiram amostras de *Staphylococcus aureus* MRSA, podendo observar a importância do estudo de bioprospecção na área médica. O interesse industrial na produção de novos compostos antimicrobianos reafirma a importância de se investigar substâncias antimicrobianas, que são produzidas por uma variedade de estirpes ambientais, tais como as amostras descritas neste trabalho.

Já para as bactérias psicrotolerantes, as estirpes 273 e 280, pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, inibiram 9 das 26 bactérias testadas. Destas 9 bactérias, 7 foram do gênero *Klebsiella*, sugerindo uma especificidade das duas estirpes psicrotolerantes em inibir predominantemente um único gênero, que em sua maioria, possui algum mecanismo de resistência a antibióticos já descrito na literatura. Esse resultado mostra que as substâncias antimicrobianas possuem espectro de ação seletivo. No artigo de Lee e colaboradores (2017), foi sequenciado o genoma completo de uma estirpe de *Pseudomonas antarctica* isolada do mesmo local que as amostras psicrotolerantes deste trabalho (King George Island), possuindo atividade antimicrobiana contra amostras de *Bacillus idriensis*. Na análise do genoma completo desta bactéria, foi possível observar a presença de um cluster completo com genes similares aos da microcina B. É de extrema importância realizar estudos visando pesquisar novos compostos com atividade antimicrobiana em estirpes resistentes à antibióticos, sendo que neste presente trabalho foi possível observar a inibição, predominantemente, da espécie *Klebsiella pneumoniae*, sendo algumas produtoras da enzima carbapenemase.

Neste trabalho, foram empregadas duas metodologias, a metodologia utilizando poços com a cultura bacteriana viva e a metodologia utilizando vapor de clorofórmio para eliminar as células bacterianas. Porém, apenas a primeira metodologia utilizada apresentou halos de inibição. Esta metodologia foi semelhante à metodologia utilizada por Lee e colaboradores (2017), na qual as células bacterianas produtoras de substâncias antimicrobianas não são mortas. Dessa forma, é possível especular a hipótese de que é necessário ter a cultura bacteriana viva das amostras psicrotolerantes 273 e 280 para que ocorra a inibição das estirpes bacterianas indicadoras.

Sánchez e colaboradores (2009) mostraram que alguns isolados psicrotolerantes, filogeneticamente semelhantes com o gênero *Pseudomonas* (90-94% de similaridade), inibiram estirpes de *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*. A atividade antimicrobiana não é alterada mesmo após a incubação por 1 hora em água fervendo e ao congelamento a -80°C e -20°C durante 24 horas. Com esses resultados, os autores afirmam que essas bactérias poderiam produzir bacteriocinas de baixa massa molecular, não sendo afetadas com mudanças de pH ou temperatura, uma característica comum de microcinas. Desta forma, é necessário pesquisar novos métodos para avaliar se a atividade antimicrobiana do presente trabalho está relacionada com a presença de bacteriocinas.

Ao analisar os resultados dos testes de antagonismo com o sobrenadante filtrado das amostras 273 e 280 do gênero *Pseudomonas*, não foi observada a presença de halos de inibição, no método com poços em placas. Dessa forma, podemos especular que a possível substância antimicrobiana só seja produzida quando há o contato direto da bactéria produtora *Pseudomonas* spp. com a bactéria indicadora, visto que, quando o sobrenadante das *Pseudomonas* spp. é filtrado, não foi observado nenhum halo de inibição. Para testar esta hipótese, podem ser realizadas diferentes metodologias. Paik (1995) utilizou membranas de diálise para estimar a massa molecular de bacteriocinas produzidas por *Listeria monocytogenes*. É possível adaptar esta metodologia para verificar se metabólitos produzidos pela estirpe indicadora são importantes para a produção da substância antimicrobiana. Tais experimentos serão realizados em nosso laboratório em breve.

Outro experimento que pode ser realizado é o uso de placas *transwell*®, como no trabalho de Standar e colaboradores (2010), no qual os autores utilizaram placas *transwell*® com uma membrana de 0,22 µm para visualizar se a interação entre *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* alterava a formação de biofilme. Com isso, os autores concluíram que o biofilme *S. mutans* foi estimulado na presença do *S. mitis*, sendo responsável por causar periodontite em humanos. De modo similar, essa metodologia pode ser aplicada para testar a hipótese do presente trabalho de que as bactérias do gênero *Pseudomonas* necessitam de estímulos provenientes de uma outra bactéria para realizar a produção de substâncias antimicrobianas.

Como foi observado no presente trabalho, não há atividade antimicrobiana no sobrenadante. Desse modo, realizaram-se testes para verificar se a falta de inibição era devido à quantidade insuficiente da substância antimicrobiana presente no sobrenadante. Para isso, foram empregadas metodologias como liofilização e concentração do extrato bruto por Speed Vac Concentrator Plus (*Eppendorf*®, Alemanha). Como resultado, foi possível observar que, mesmo concentrando o sobrenadante, não houve atividade antimicrobiana. Dessa forma, pode-se levantar uma hipótese alternativa de que há necessidade de um contato célula-célula para que ocorra a inibição (Ruhe *et al.*, 2013). Esta hipótese foi corroborada pelo resultado da metodologia da lise celular, por ação de detergentes e mecânica, pois não houve halos de inibição mesmo com a lise celular.

Pukatzki e colaboradores (2006) descreveram um sistema de competição, denominado de sistema de secreção do tipo VI (T6SS), baseado na inibição contato dependente, no gênero *Vibrio*. Sharp e colaboradores (2017) identificaram o mesmo sistema de secreção no gênero *Pseudomonas*. Esse sistema de secreção media a transferência de moléculas efetoras,

assemelhando-se com o sistema de infecção do tipo fago e com certas características de piocinas S, como, por exemplo, a necessidade de uma proteína de imunidade para prevenir a auto inibição (Bönemann *et al.*, 2010). Desta forma, é necessário investigar se: as substâncias antimicrobianas são transferidas pelo sistema de secreção do tipo VI; se as substâncias antimicrobianas são secretadas para o meio extracelular; ou se as substâncias não são secretadas para o meio extracelular, como citado por Braun e colaboradores (2002). Esses autores afirmam que células que sintetizam colicina sem proteína de transporte para o meio extracelular retêm mais de 90% da colicina na célula produtora, sendo necessário estudar metodologias para purificar este tipo de substância, que pode ficar associada na membrana periplasmática.

As amostras 273 e 280 de *Pseudomonas* do presente estudo apresentaram halos de inibição mesmo quando aplicada protease e NaOH. De acordo com Rebuffat (2012), as bactérias Gram-negativas podem produzir bacteriocinas tipo colicina (30-80kDa) e microcina (10kDa) resistentes a proteases, pH e temperaturas extremas. Kaur e Kaur (2015) demonstraram que piocinas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* do tipo R e tipo F são resistentes a nucleases e proteases, enquanto piocinas do tipo S são sensíveis a proteases. Assim, é possível especular que as amostras de *Pseudomonas* do presente trabalho sejam produtoras de substâncias antimicrobianas resistentes a proteases, possuindo especificidade para amostras de *Klebsiella pneumoniae*, já que há relatos na literatura de bacteriocinas resistentes a protease.

As piocinas, que são bacteriocinas produzidas pelo gênero *Pseudomonas*, possuem três diferentes classificações: tipo R e tipo F, de massa molecular elevada, assemelhando-se com caudas de fagos, sendo o R não flexível e contrátil e o F flexível e não contrátil. Além disso, existe a piocina tipo S, que possui baixa massa molecular, sendo sensível a protease e ao calor, enquanto os tipos R e F são resistentes a proteases. Neste trabalho, por conta dos resultados obtidos, podemos sugerir que as amostras de *Pseudomonas* isoladas da Antártica podem ser produtoras de bacteriocinas do tipo R e F. Essas bacteriocinas assemelham-se a caudas de bacteriófagos, possuindo uma ancestralidade em comum com outros fagos. Desta forma, é necessário realizar experimentos, visando a analisar se a inibição das amostras de *Klebsiella pneumoniae* ocorreu devido à presença de bacteriocinas tipo piocinas.

Como piocinas tipo R e F, produzidas por estirpes de *Pseudomonas*, são resistentes a proteases, é necessário investigar se as amostras deste trabalho podem ser produtoras deste tipo de bacteriocina, que precisa ter sua produção induzida por estresse celular. Ao analisar a metodologia de indução de fagos lisogênicos por UV, neste trabalho, pode-se observar que

não houve a presença de áreas de lise. Isso pode ter ocorrido devido à metodologia utilizada, sendo assim, não é possível afirmar que a inibição não ocorre por ação de fagos lisogênicos ou por ação de substâncias semelhantes a cauda de fago, devido à existência de outras metodologias que podem ser aplicadas. No artigo de Scholl e colaboradores (2009), foi realizada a indução da produção de piocina tipo R, produzida por amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, através do uso de mitocina C (3 µg/mL) e Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (0.25 mM) ou 0,2% de arabinose, seguido de uma incubação por 2 horas e 30 minutos, para que ocorra a lise celular e a liberação dos fagos. Nesse artigo, os autores relatam a alta especificidade desta bacteriocina para eliminar um único patógeno, *E. coli*, para o uso em produtos alimentares, já que este patógeno está relacionado com infecções alimentares. No presente trabalho, também foi relatada a inibição predominantemente do gênero *Klebsiella*.

Em outro artigo, de Morse e colaboradores (1976), a indução e purificação de piocinas tipo R produzidas pelo gênero *Pseudomonas* foi realizada suspendendo o pellet bacteriano em 1:10 do volume original em uma solução contendo NaCl 0,85% e cloridrato de cisteína 0,1% (pH 6,5), incubado em agitação, para depois adicionar mitocina C 1 µg/mL, causando a lise celular. O sobrenadante resultante foi tratado com clorofórmio (5% vol/vol) para remover os detritos celulares e purificando a piocina da amostra.

As amostras de *Pseudomonas* 273 e 280, utilizadas no presente trabalho, podem ser usadas futuramente para eliminar de forma seletiva patógenos específicos do gênero *Klebsiella*, podendo possuir aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica após estudos mais detalhados. Além disso, as substâncias antimicrobianas das amostras deste trabalho são resistentes a proteases, podendo ser um indício que se trata de uma piocina R ou F tipo cauda de fago, que contém uma bainha contrátil responsável por formar poros na membrana da amostra antagonista, causando o rompimento da membrana (Uratani e Hoshino, 1984).

Neste trabalho, a qualidade da extração de DNA das estirpes 273 e 280 foi calculada pelo equipamento NanoDrop (Thermo Fisher®), através da absorbância 260/280 e 260/230. A absorbância 260/280 é utilizada para avaliar a pureza do DNA, sendo os resultados próximos ao valor de 1,8, indicativo de boa qualidade da amostra. A absorbância 260/230 é um parâmetro secundário de avaliação da pureza do DNA. Quanto mais próximo de 2,0-2,2, menos impureza existe na amostra. Com isso, foi possível determinar que as estirpes 273 e 280 apresentaram quantidades de DNA satisfatórias, com qualidade dentro dos limites aceitáveis para a realização do sequenciamento.

Algumas estirpes de *Pseudomonas* spp. produzem bacteriocinas tipo piocinas, que se diferem pela morfologia e modo de eliminar a bactéria antagonista, possuindo ação específica. Shinomiya e Ina (1989) sugeriram que piocinas do tipo R e os bacteriófagos de *Pseudomonas*, tipo o OS-17, são descendentes do mesmo bacteriófago ancestral. Desta forma, com os resultados obtidos no presente trabalho, é necessário investigar se a atividade antimicrobiana está ocorrendo devido à presença de uma bacteriocina semelhante a fagos defectivos, resultando em atividade antimicrobiana. As aplicações destas substâncias antimicrobianas em alimentos e em infecções hospitalares podem ser exploradas futuramente, mediante uma maior caracterização destas, assim como o sequenciamento e análise do genoma completo das estirpes 273 e 280, para a busca de genes relacionados com microcinas e piocinas. Já para as amostras termotolerantes, é necessário investigar a origem da inibição, verificando se esta é causada por ação de uma bacteriocina, tendo visto que na literatura há relatos de produção de lantibióticos em amostras de *Geobacillus* e *Brevibacillus*.

A atividade antimicrobiana não é restrita apenas por ação de bacteriocinas, podendo ocorrer também na presença de biossurfactantes. Os biossurfactantes são compostos biológicos anfipáticos, contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas. A porção hidrofóbica é composta por um ácido graxo de cadeia longa, enquanto a porção hidrofílica pode ser composta por um carboidrato, peptídeo, ácido carboxílico ou álcool (Katemai *et al.*, 2008). Youssef e colaboradores (2004) demonstram a produção de biossurfactantes com atividade antimicrobiana em estirpes de *Pseudomonas*, na qual podem produzir ramnolipídeos com potencial de emulsificar o óleo, sendo biodegradável e com potencial aplicação na indústria e no ambiente. Além disso, os autores El-Sheshtawy e Doheim (2014) observaram atividade antimicrobiana em biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* contra estirpes de *Sarcina lutea*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus pumilus*, *Penicillium chrysogenum* e *Candida albicans*. Dessa forma, os biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* spp. podem ter atividade antimicrobiana de amplo espectro, tendo aplicação na indústria farmacêutica e em cosméticos como emulsificante com ação antimicrobiana (Mandal *et al.*, 2013). As amostras 273 e 280 do presente estudo serão futuramente analisadas para verificar se a atividade antimicrobiana está ocorrendo devido à ação de biossurfactantes, já que estes também possuem atividade antimicrobiana e são produzidos por estirpes de *Pseudomonas*.

Em resumo, as amostras bacterianas de ambientes extremos podem ter evoluído para produzir substâncias antimicrobianas, com o objetivo de competir pela colonização e obtenção de nutrientes, já que nestes locais há baixa disponibilidade de nutrientes, sendo necessário competir com outras amostras bacterianas.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que:

Há atividade antimicrobiana em quatro amostras, duas psicotolerantes e duas termotolerantes. As duas amostras psicotolerantes são do mesmo gênero, *Pseudomonas*, que é uma espécie que já possui relatos na literatura de produção de bacteriocinas. A produção do antimicrobiano não foi letal para as cepas produtoras, apresentando um amplo espectro de inibição contra bactérias patogênicas, principalmente contra a espécie *Klebsiella pneumoniae*, sendo algumas estirpes resistentes a antibióticos, produtoras de carbapenemase, ressaltando mais uma vez a importância de estudos envolvendo a busca de antimicrobianos eficazes contra estirpes resistentes à antibióticos.

Os resultados mostram que não ocorre atividade antimicrobiana no sobrenadante das células psicotolerantes, mesmo quando conduzidos métodos de concentração, sugerindo que a substância antimicrobiana não é secretada para o meio extracelular. Quando realizada a lise celular pelo método mecânico (FastPrep), ocorre a atividade antimicrobiana, mas, quando o sobrenadante do lisado é filtrado, não ocorre a presença de halos de inibição, sugerindo que a atividade antimicrobiana só ocorre quando a bactéria produtora é exposta a estímulos provenientes da bactéria indicadora, podendo produzir assim compostos tais como bacteriocinas ou biossurfactantes com atividade antimicrobiana. As amostras psicotolerantes crescem entre pH 7 e 7,5, durante um período de 24h até 96h, sendo sua atividade antimicrobiana reduzida após esse tempo.

O DNA extraído das amostras psicotolerantes e termotolerantes será futuramente sequenciado para análises de bioinformática, visando procurar genes relacionados com a produção de substâncias antimicrobianas.

Em síntese, esse trabalho mostrou que bactérias isoladas de ambientes extremos podem ser uma valiosa fonte de substâncias antimicrobianas, podendo ter aplicações na indústria farmacêutica e em produtos que envolvem processos em temperaturas baixas, como na indústria alimentícia de produtos que necessitam de equipamentos frigoríficos, como carnes e sorvetes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. (2007). Mecanismos de ação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Aoki, S.K., Poole, S.J., Hayes, C.S., Low, D.A. (2011). Toxin on a stick: Modular CDI toxin delivery systems play roles in bacterial competition. *Virulence* 2, 356-359.
- Arnorsdottir, J., Sigtryggsdottir, A.R., Thorbjarnardottir, S.H., Kristjansson, M.M. (2009). Effect of proline substitutions on stability and kinetic properties of a cold adapted subtilase. *J Biochem.* 145, 325-329.
- Andrade, C.M.M.C., Jr, N.P., Antranikian, G. (1999). Extremely Thermophilic Microorganisms and Their Polymerhydrolytic Enzymes. *Rev Microbiol.* 30, 287-298.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Morre, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol.* 46, 446-475.
- Bastos, M.C.F. e Penido, E.G.C. (1981). Transduction in *Staphylococcus aureus*: I. Selection of donor and recipient strains for drug resistance genes. *Ver. Brasil. Genet.* 4, 29-39.
- Bezsudnova, E.Y., Boyko, K.M., Polyakov, K.M., Dorovatovskiy, P.V., Stekhanova, T.N., Gumerov, V.M., Ravin, N.V., Skryabin, K.G., Kovalchuk, M.V., Popov, V.O. (2012). Structural insight into the molecular basis of polyextremophilicity of short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*. *Biochimie* 94, 2628-2638.
- Black, E.P., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F. (2005). The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 6, 286-292.
- Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Mogk, A. (2010). Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Mol Microbiol.* 76, 815-821.
- Braun, V., Patzer, S.I., Hantke, K. (2002). Ton-dependent colicins and microcins: Modular design and evolution. *Biochimie* 84, 365-380.
- Brody, Larner e Minneman. (1998). *Human Pharmacology*. (3ª ed.) Missouri: Mosby.
- Cabrera, M.A., Blamey, J.M. (2018). Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biol Res.* 51, 37-52.
- Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C., Cowan, D.A. (2010). Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends microbiol.* 18, 374-381.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Casvard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiol Mol Biol.* 71, 158-229.
- Cavalcante, M.P., Lopes, H.F.S., Silveira, I.A., Santos, E.C.G. (2013). Investigação de substância tipo bacteriocina em amostras não humanas e ambientais. *Revista Científica Facider* 3, 79-97.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. Atlanta: US Department of Health and Human Services.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Lad, S.J., Phansalkar, M.S., Rupp, R.H., Ganguli, B.N. (1992). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 45, 832-838.

- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., Van der donk, W.A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics (review). *ChemVer.* 105, 663-684.
- Chawawisit, K., Lertcanawanichakul, M. (2008). Minimum inhibitory concentration (MIC) of crude preparations of *Brevibacillus laterosporus* SA14 bioactive material compared to vancomycin and oxacillin, against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol.* 24, 2199-2204.
- Chen, J., Stites, W.E. (2004). Replacement of staphylococcal nuclease hydrophobic core residues with those from thermophilic homologues indicates packing is improved in some thermostable proteins. *J Mol Biol.* 344, 271-280.
- Chen, G.Q., Jiang, X.R. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 50, 94-100.
- Chintalapati S., Kiran M.D., Shivaji S. (2004). Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell Mol Biol.* 50, 631-642.
- Clardy, J., Fischbach, M., Currie, C. (2009). The natural history of antibiotics. *Curr Biol.* 19, 437-441.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology (London)* 3, 777-788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 11, 95-105.
- Counts, J.A., Zeldes, B.M., Lee, L.L., Straub, C.T., Adams, M.W.W., Kelly, R.M. (2017). Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms. *Wires Syst Boil Med* 9.
- Cowan, D.A., Smolenski, K.A., Daniel, R.M., Morgan, H.W. (1987). An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaeobacterium *Desulfurococcus* growing at 88 degrees C. *Biochem J.* 247, 121-133.
- Cowan, D.D. (2014). *Antarctic Terrestrial Microbiology: Physical and Biological Properties of Antarctic Soils.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Cowan D.A. e Tow L.A. (2004). Endangered antarctic environments. *Annu Rev Microbiol.* 58, 649-690.
- D'Amico, S., Collins, T, Marx, J.C., Feller, G., Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *European Molecular Biology Organization* 7, 385-389.
- DOU (Diário Oficial da União). Poder Executivo, de 22 de janeiro de 1996
- Drake, J.W. (2009). Avoiding dangerous missense: thermophiles display especially low mutation rates. *Plos Genet* 5.
- Drider, D. e Rebuffat, S. (2011). Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Ed. New York: Springer 1, pp. 3-55.
- Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13, 200-209.
- Dziewit, L., Cegielski, A., Romaniuk, K., Uhrynowski, W., Szych, A., Niesiobedzki, P. (2013). Plasmid diversity in arctic strains of *Psychrobacter* spp. *Extremophiles* 17, 443-444.
- El-Sheshtawy, H.S. e Doheim, M.M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum* 23, 1-6.
- Farhoud, M.H., Wessels, H.J., Steenbakkens, P.J., Mattijssen, S., Wevers, R.A., van Engelen, B.G., Jetten, M.S., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Keltjens, J.T. (2005). Protein complexes in the archaeon

- Methanothermobacter thermautotrophicus analyzed by blue native/SDS-PAGE and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 4, 1653-1663.
- Feller, G. e Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature Rev Microbiol*. 1, 200-208.
- Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 24, 7-17.
- Fields, F.O. (1988). Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. *J. Food Prot, Washington* 1, 72-77.
- Field, D., Hill, C., Cotter, P. D., Ross, R. P. (2010). The dawning of a 'Golden era' in lantibiotic bioengineering. *Mol Microbiol*. 78, 1077-1087.
- Foophow, T., Foophow, T., Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S. (2010). Subtilisinlike serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* with N- and C-terminal propeptides. *Protein Eng Des Sel*. 23, 347-355.
- Fortun, K. (2012). Ethnography in late industrialism. *Cultural Anthropology* 27, 446-464.
- Friedman, R., Drake, J.W., Hughes, A.L. (2004). Genome-wide patterns of nucleotide substitution reveal stringent functional constraints on the protein sequences of thermophiles. *Genetics* 167, 1507-1512.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F., Diep, D.B. (2014). Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology, Washington* 82, 1-24.
- Garcia, E.C., Anderson, M.S., Hagar, J.A., Cotter, P.A. (2013). *Burkholderia* BcpA mediates biofilm formation independently of interbacterial contact-dependent growth inhibition. *Mol Microbiol*. 89, 1213-1225.
- Ghequire, M.G.K., Garcia-Pino, A., Lebbe, E.K.M., Spaepen, S., Loris, R. (2013). Structural Determinants for Activity and Specificity of the Bacterial Toxin LlpA. *PLoS pathogens*. 9, 1003199-1003199.
- Ghequire, M.G.K. e Mot, R.D. (2014). Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol*. 38, 523-568.
- Giambiagi-Demarval, M., Mafra, M.A., Penido, E.G.C., Bastos, M.C.F. (1990). Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 136, 1591-1599.
- Glatthardt, T.S.S. (2016). Atividade de compostos secretados por *Staphylococcus epidermidis* isolado de microbiota de pele na produção de biofilme por amostras clínicas de *Staphylococcus aureus*. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências (Microbiologia)) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Gomes, E., Souza, A.R., Orjuela, G.L., Silva, R., Oliveira, T.B., Rodrigues, A. (2016). Applications and Benefits of Thermophilic Microorganisms and Their Enzymes for Industrial Biotechnology. In: *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. 1a Ed. Suíça: Springer, pp. 459-474.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *CR Soc Biol*. 93, 1041-1042.
- Gross, E. e Morell, J.L. (1971). The structure of nisin. *J Am Chem Soc*. 93, 4634-4635.
- Grossart, H.P., Kiorboe, T., Tang, K., Ploug, H. (2003). Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Appl Environ Microbiol*. 69, 3500-3509.
- Guasch, J.F., Enfedaque, J., Ferrer, S., Gargallo, D., Regue, M. (1995). Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes. *Res Microbiol*. 146, 477-483.
- Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T. (2010). Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agentes. *Química Nova* 33, 667-679.

- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H.I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in microbiology* 5, 288.
- Hardy, K.G. (1975). Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol.* 39, 464-515.
- Hayes, C.S., Koskiniemi, S., Ruhe, Z.C., Poole, S.J., Low, D.A. (2014). Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4.
- Horikoshi, K. (1995). Discovering novel bacteria with an eye to biotechnological applications. *Curr. Opin. Biotech.* 6, 292-297.
- Inglis, R.F., Brown, S.P., Buckling, A. (2012). Spite versus cheats: competition among social strategies shapes virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution* 66, 3472-3484.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol.* 39, 171-200.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A., Wollman, E. (1953). Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 84, 222-224.
- Jia Z. e Davies P.L. (2002). Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem Sci.* 27, 101-106.
- Karner, M.B., DeLong, E.F., Karl, D.M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 507-510.
- Katamai, W., Maneerat, S., Kawai, F., Kanzaki, H., Nitoda, T., H-Kittikun, A. (2008). *J Gen Appl Microbiol.* 54, 79-82.
- Kaur S. e Kaur S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Front Pharmacol.* 6, 272.
- Kissling, G.E., Grogan, D.W., Drake, J.W. (2013). Confounders of mutation-rate estimators: selection and phenotypic lag in *Thermus thermophilus*. *Mutat Res.* 749, 16-20.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* 12, 39-85.
- Kleanthous, C. (2010). Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat Rev Microbiol.* 8, 843-848.
- Klerk H.C. e Smit, J.A. (1967). Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *J Gen Microbiol.* 48, 309-316.
- Kusakabe, M., Nagao, K., Ohba, T., Hun-Seo, J., Park, S., Lee, J., Park, B. (2009). Noble gas stable isotope geochemistry of the thermal fluids from Deception Island, Antarctica. *Antarct Sci.* 21, 255-267.
- Landecker, H. (2016). Antibiotic Resistance and the Biology of History. *Body & Society* 22, 19-52.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S.A.B., Hardman, A., Downie, A., O'Gara, F., Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146, 2469-2480.
- Lee, J., Cho, Y.J., Yang, J.Y., Jung, Y.J., Hong, A.G., Kim, O.S. (2017). Complete genome sequence of *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494, a bacteriocin-producing psychrophile isolated from Antarctica. *Elsevier Journal of Biotechnology* 259, 15-18.
- Ligozzi, M., Aldegheri, M., Predari, S.C., Fontana, R. (1991). Detection of penicillin-binding proteins immunologically related to penicillin-binding protein 5 of *Enterococcus hirae* ATCC 9790 in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters* 67, 335-339.

- Mandal, S.M., Barbosa, A.E., Franco, O.L. (2013). Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. *Biotechnol Adv.* 31, 338–345.
- Madigan, M.T., Martin, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. (2016). *Microbiologia de Brock*. 14a Ed. Porto Alegre: Artmed, pp. 488-489.
- Masschalck, B., Garcia-Graells, C., Haver, E.V., Michiels, C.W. (2000). Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lisozyme and nisin under high pressure. *Innov Food Sci Emerg.* 1, 39-47.
- Marx, J.C., Collins, T., D'Amico, S., Feller, G., Gerday, C. (2006). Cold-Adapted Enzymes from Marine Antarctic Microorganisms. *Marine Biotechnology* 1, 1-11.
- Mayr, J., Lupas, A., Kellermann, J., Eckerskorn, C., Baumeister, W., Peters, J. (1996). A hyperthermostable protease of the subtilisin family bound to the surface layer of the archaeon *Staphylothermus marinus*. *Curr Biol.* 6, 739-749.
- Michel-Briand, Y. e Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84, 499-501.
- Moller, A.K., Barkay, T., Hansen, M.A., Norman, A., Hansen, L.H., Sorensen, S.J. (2014). Mercuric reductase genes (*merA*) and Mercury resistance plasmids in High Arctic snow, freshwater and sea-ice brine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 52-63.
- Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Leitão, M.F.F. (1999). Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. *Ver Microbiol (São Paulo)*. 30, 130-136.
- Morse, S.A., Vaughan, P., Johnson, D., Iglewski, B.H. (1976). Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a Bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotheray* 10, 354-362.
- Nair, S. e Simidu, U. (1987). Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl Environ Microbiol.* 53, 2957-2962.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology (Washington)* 189, 1189-1198.
- Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257, 1064-1073.
- Neushul, P. (1993). Science, government and the mass production of penicillin. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 48, 371-395.
- Noga, E.J., Silphaduang U. (2003). Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News & Perspectives* 16, 87-92.
- Nomura, M. (1963). Mode of action of colicins. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol.* 28, 315-324.
- O'Brien, A., Sharp, R., Russell, N., Roller, S. (2004). Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol.* 48, 157-167.
- Ogaki, M.B. e Maia, L.F. (2015). Review: General aspects of bacteriocinas (Campinas) 18, 267-276.
- Orzech, K.M., Nichter, M. (2008). From resilience to resistance: Political ecological lessons from antibiotic and pesticide resistance. *Annual Review of Anthropology* 37, 267-282.
- Paik, H.D. (1995). Enhanced production, purification, and characterization of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* P127. Tese de Doutorado (Doutorado em Food Science and Human Nutrition) - Iowa State University.
- Palleroni, N., Kunisawa, R., Contopoulou, R., Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 23, 333-339.

- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *J Brazilian Archives of Biology and Technology* 50, 521-542.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, 4943-4960.
- Parret, A.H.A. e Mot, R. (2002). Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trands in Microbiology* 10, 107-112.
- Patterson, M.F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *J Appl Microbiol.* 98, 1400-1409.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., Pampliano, D.L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Ver. Drug Discovery* 1, 6-29.
- Phadtare S. (2004). Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. *Sci STKE.* 15, 26.
- Plaza, G.A., Zjawiony, I., Banat, I.M. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50, 71-77.
- Pokusaeva, K., Kuisiene, N., Jasinskyte, D., Rutiene, K., Saleikiene, J. (2009). Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Cent Eur J Biol.* 4, 196-203.
- Pollack, M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D., Benneths, J., Dolin, R. (eds.). *Principles and practice of infections diseases*.
- Pons, A.M., Lanneluc, G., Cotteceau, G., Sablé, S. (2002). New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84, 531-537.
- Prudêncio, C.V., Santos, M.T., Vanetti, M.C. (2015). Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *J Food Sci Technol.* 52, 5408-5417.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., Mekalanos, J.J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *P Natl Acad Sci.* 103, 1528-1533.
- Rampelotto, P.H. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life* 3, 482-485.
- Rebuffat, S. (2012). Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem Soc Trans.* 40, 1456-1462.
- Rezende, A.C.V. (2010). Isolamento e Caracterização de Bacteriófagos para biocontrole de *Salmonella enterica*. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.
- Rice, L.B. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol.* 12, 476-481.
- Richard, J.F. e Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 6, 25-64.
- Riley, M. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin Evolution. *Ann Ver Gen.* 35, pp. 225-278.
- Riley, M.A. e Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu Ver Microbiol.* 56, 37-117.
- Rodrigues, J.P.A. (2013). Estudo comparativo entre antibióticos de origem natural e semissintética da família das penicilinas em bactérias Gram positivo. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais) - Universidade de Salamanca.

- Ruhe, Z.C., Low, D.A., Hayes, C.S. (2013) Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends in Microbiology* 21, 230-237.
- Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 337-346.
- Russell, N.J. (1997). Psychrophilic bacteria: Molecular adaptations of membrane lipids. *Comp Biochem Physiol.* 118, 489-493.
- Russell, A.B., Peterson, S.B., Mougous, J.D. (2014). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol.* 12, 137-148.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, L.A., Gómez, F.F., Delgado, O.D. (2009). Cold-adapted microorganisms as a source of new antimicrobials. *Extremophiles* 13, 111-120.
- Santos, N.Q. (2004). Bacterial resistance in the context of hospital infection. *Contexto Enferm.* 13, 64-70.
- Scholl, D., Cooley, M., Williams, S.R., Gebhart, D., Martin, D., Bates, A., Mandrell, R. (2009). An Engineered R-Type Pyocin Is a Highly Specific and Sensitive Bactericidal Agent for the Food-Borne Pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 3074-3080.
- Schultz, J. (2016). *Bioprospecção de Microrganismos Termófilos da Antártica. Plano de tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.*
- Schulz, D., Pereira, M.A., Bonelli, R.R., Nunes, M.M., Batista, C.R.V. (2003). Bacteriocinas: Mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alim Nutr (Araraquara).* 14, 229-235.
- Sharp, C., Bray, J., Housden, N.G., Maiden, M.C.J., Kleanthous, C. (2017). Diversity and distribution of nuclease bacteriocins in bacterial genomes revealed using Hidden Markov Models. *PLoS Comput Biol* 13.
- Shinomiya, T., Ina, S. (1989). Genetic comparison of bacteriophage PS17 and *Pseudomonas aeruginosa* R-type pyocin. *J Bacteriol.* 171, 2287-2292.
- Silva, A.C., Rachid, C.T.C.C., Jesus, H.E., Rosado, A.S.S., Raquel, S.P. (2017). Predicting the biotechnological potential of bacteria isolated from Antarctic soils, including the rhizosphere of vascular plants. *Springer, Verlag Berlin Heidelberg* 40, 1393-1407.
- Silva, F.M. (2003). *Caracterização de bacteriocinas produzidas por Streptococcus agalactiae isolados de mastite bovina Bioprospecção de Microrganismos Termófilos da Antártica. Monografia (Microbiologia e Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.*
- Standar, K., Kreikemeyer, B., Redanz, S., Münter, W.L., Laue, M., Podbielski, A. (2010). Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *BMC Microbiol.* 17.
- Straub, C.T., Zeldes, B.M., Schut, G.J., Adams, M.W.W., Kelly, R.M. (2017). Extremely thermophilic energy metabolisms: Biotechnological prospects. *Curr Opin Biotechnol.* 45, 104-112.
- Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B. (1996). Quorum sensing: a population density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci.* 21, 214-219.
- Terrence H.B., Katrina L.C., Lyle, G.W., Charles, W.G. (2013). Microbial Competition in Polar Soils: A Review of an Understudied but Potentially Important Control on Productivity. *Biology* 2, 533-554.
- Thornley, M.J. e Sharpe, M.E. (1959). Microorganisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic sporeformers. *Journal of Applied Bacteriology* 22, 368-376.

- Tropeano, M., Vazquez, S., Coria, S., Turjanski, A., Cicero, D., Bercovich, A., Mac Cormack, W. (2013). Extracellular hydrolytic enzyme production by proteolytic bacteria from the Antarctic. *Polish Polar Res.* 34, 253-267.
- Turner, J., Bindschadler, R., Convey, P., Prisco, G. D., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D., Mayewski, P., Summerhayes, C. (2009a). Antarctic Climate Change and the Environment. *Scientific Committee on Antarctic Research (Cambridge)* 21, 541-563.
- Turner, J., Anderson, P.S., Lachlan-Cope, T.A., Colwell, S.R., Phillips, T., Kirchgaessner, A., Marshall, G.J., King, J.C., Bracegirdle, T.J., Vaughan, D.G., Lagun. (2009b). The record low surface air temperature at Vostok station, Antarctica. *Journal of Geophysical Research - Atmospheres* 114, 148-227.
- Urutani, Y., Hoshino, T. (1984). Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J Bacteriol.* 157, 632-636.
- Vanden Berghee, D.A. e Vlietinck, A.J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, 47-69.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., Peduzzi, J. (2010). Siderophore microcins form the first Family of structure-related antimicrobial peptides from Enterobacteriaceae: isolation and characterization of microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 228-297.
- Vaz, E.K. (2009). Antimicrobial resistance: how it appears and what it represents for swine production. *Sientiae Veterinariae* 37, 147-150.
- Vishniac, H., Klinger, J. (1986). Yeasts in the Antarctic deserts. *Perspectives in Microbial Ecology* 4, 46-51.
- Völkl, P., Markiewicz, P., Stetter, K.O., Miller, J.H. (1994). The sequence of a subtilisin-type protease (aerolysin) from the hyperthermophilic archaeum *Pyrobaculum aerophilum* reveals sites important to thermostability. *Protein Sci.* 3, 1329-1340.
- Von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Habich, D. (2006). Antibacterial natural products in medicinal chemistry. Exodus or revival? *Angew Chem Int Ed Engl.* 45, 5072-5129.
- Walsh, C. e Wenczewicz, T. (2016). *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. ASM Press, Washington, DC: pp. 16-26.
- Wang, Q., Cen, Z., Zhao, J. (2015). The survival Mechanisms of Thermophiles at High Temperatures: An Angle of Omics. *Physiology* 30, 97-106.
- Watson R., Rowsome W., Tsao J., Visentin L.P. (1981). Identification and characterization of Col plasmids from classical colicin E-producing strains. *J Bacteriol.* 147, 569-577.
- Woodruff, H.B. (2014). Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. *Applied and environmental microbiology* 80, 2-8.
- Wright, P.M., Seiple, I.B., Myers, A.G. (2014). The evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 8840-8869.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front in Microbiol Rev.* 5, 241.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56, 339-347.
- Zhan, D., Bai, A., Yu, L., Han, W., Feng, Y. (2014). Characterization of the PH1704 protease from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and the critical functions of Tyr120. *PLoS ONE* 9.

Zhang, C. e Kim, S.K. (2010). Research and application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar drug* 8, 1920-1934.

ANEXOS

Anexo I

Meio LB Sólido (Luria Bertani)

Peptona	10 g
Cloreto de Sódio	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Ágar	20 g
Água Destilada	1000 mL

pH 7.2

Se for líquido, retirar o Ágar.

Anexo II

Semissólido 1% Ágar Nutriente

Triptona	1 g
Extrato de Levedura	2 g
Peptona	5 g
Cloreto de Sódio	5 g
Ágar	10 g
Água Destilada	1000 mL

pH 7.2

Anexo III**Tampão para fagos**

MgSO ₄ 0,5 M	2 mL
CaCl ₂ 1,0 M	4 mL
Tris/HCl 1 M pH 7.8	50 mL
NaCl	6 g
Gelatina	1 g
Água Destilada	1000 mL

pH 7.5

Anexo IV**CTAB**

CTAB	20 g
NaCl	81,2 g
EDTA (O, 5 M)	40 mL
Tris-Cl pH 8,0 (1 M)	100 mL
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	10 g
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	30 g
Água Destilada	1000 mL

CTAB/NaCl

CTAB	10 g
NaCl	4,1 g
Água Destilada	10 mL

Anexo V**TBE**

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA pH 8.0 0,5 M	40 mL
Água Destilada	1000 mL