



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA DE MEDEIROS CHAGAS

***Brevibacillus brevis* LABIM 17:**
POTENCIAL FONTE DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

LARISSA DE MEDEIROS CHAGAS

***Brevibacillus brevis* LABIM 17:**
POTENCIAL FONTE DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Coorientador: Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

c433	<p>Chagas, Larissa. Brevibacillus brevis LABIM 17: potencial fonte de novos antimicrobianos / Larissa Chagas. - Londrina, 2022. 52 f. : il.</p> <p>Orientador: Prof Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior. Coorientador: Profa. Dra. Lucy Megume Yamauchi Lioni. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2022. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Antibióticos naturais - Tese. 2. metabolismo secundário - Tese. 3. resistência bacteriana - Tese. I. Gonçalves de Oliveira Junior, Prof Dr. Admilton . II. Megume Yamauchi Lioni, Profa. Dra. Lucy. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 579</p>
------	--

LARISSA DE MEDEIROS CHAGAS

***Brevibacillus brevis* LABIM 17:**
POTENCIAL FONTE DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de
Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo
Centro Universitário Ingá – Uningá

Prof. Dr. José Francis de Oliveira
University of Alabama – UA

Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 14 de janeiro de 2022.

À minha família e amigos. Obrigada pela força, apoio, torcida e compreensão sem
você nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao programa de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina por todo o crescimento acadêmico e pessoal alcançado e, também, a Fundação Araucária pela bolsa de estudos que fomentou toda essa jornada e possibilitou o desenvolvimento do presente estudo.

Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, meu orientador, obrigada por estar ao meu lado diante de tantos desafios e trazer tanto crescimento profissional, acadêmico e pessoal para minha vida.

A Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, coorientadora, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, por sua paciência, dedicação e ajuda para que esse sonho se realizasse.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Microbiologia por todo o apoio, preocupação e boas energias enviadas quando tudo era escuridão.

Aos meus colegas de laboratório, Mirela, Rosiane, Allan, Gustavo e Julia e a todos os membros do LABIM, esse trabalho também é de vocês.

Ao meu namorado Fabio André Bernardo por toda a ajuda, paciência e amor dedicados a mim. Por ser meu incentivador mesmo quando o cansaço tomava conta. Amo você.

À minha mãe, minha família e meus amigos que sempre torceram e vibraram genuinamente em cada pequena vitória. Obrigada!

“A ciência é muito mais que um corpo de conhecimento. É uma maneira de pensar”

Carl Sagan

RESUMO

CHAGAS, Larissa de Medeiros. ***Brevibacillus brevis* LABIM 17**: potencial fonte de novos antimicrobianos. 2022. 52 f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Com o surgimento das “superbactérias” e a descrição de mecanismos de resistência bacteriana contra diversos medicamentos disponíveis no mercado, se faz necessária a busca por novos bioativos antimicrobianos. Bactérias ambientais têm se mostrado valiosas ferramentas nessa busca, uma vez que têm capacidade de produzir compostos bioativos como produtos de seu metabolismo secundário. Diante deste cenário o presente estudo teve por objetivo a prospecção de bactérias produtoras de antibióticos, bem como estudar alguns parâmetros de produção e estabilidade. Inicialmente, foi feita a caracterização fenotípica de 33 isolados em solo de um fragmento de floresta secundária semidecídua em Londrina-PR, Brasil (23 ° 19'37,8 "S 51 ° 12'22,4" O). Dentre os isolados prospectados, 100% eram Gram positivas, 67% apresentavam a capacidade de produzir endósporos e 94% apresentavam-se na forma de bacilos. Deu-se prosseguimento, então aos testes de atividade antagônica por cultura dupla contra os patógenos *Acinetobacter baumannii* (oxa23-positivo), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 8739 apenas com os isolados que apresentavam morfologia de bacilos e capacidade de produzir endósporos. Dentre os 22 isolados submetidos ao teste de cultura-dupla, LABIM 17 o único isolado capaz de inibir todos os três marcadores, mostrando assim uma atividade de amplo espectro. A identificação molecular por rDNA 16S classificou LABIM17 como *Brevibacillus* sp. LABIM 17. Por fermentação líquida submersa foi avaliado a produção de metabólitos extracelulares antibacterianos por LABIM 17. Os resultados obtidos demonstraram a produção de metabólitos extracelulares antibacterianos em meio MAK a partir de 72 h. Afim de avaliar a estabilidade dos metabólitos, sobrenadante livre de células foram submetidos a diferentes temperaturas e comprimentos de onda de luz visível e UV. Os resultados demonstraram que os metabólitos foram estáveis a temperaturas abaixo de 70°C e sob todos os comprimentos de onda testados. Em antecipação a futuras análises genômicas em profundidade e suas aplicações potenciais, realizamos o sequenciamento completo do genoma da LABIM 17 e foi identificada como *Brevibacillus brevis*. Em análises preliminares de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários antibacterianos foram identificados agrupamentos para produção de Petrobactina, Octapeptina, Tirocidina, Gramicidina, Zwittermicin e Aurantinina. Todos estes resultados sugerem que *B. brevis* LABIM 17 tem um bom potencial para uso como agente produtor de antibacterianos, porém mais estudos são necessários para purificação, caracterização e aumento de produção dos compostos antibacterianos.

Palavras-chave: antibióticos naturais; metabolismo secundário; resistência bacteriana.

ABSTRACT

CHAGAS, Larissa de Medeiros. ***Brevibacillus brevis* LABIM 17**: potential source of new antimicrobials. 2022. 52 p. Thesis (Doctor's Degree in Microbiology), Universidade Estadual de Londrina, 2022

The raise of “superbacteria” and discovery of bacterial antibiotic resistance mechanisms against several clinical available drugs created the need to seek new antibacterial drugs. Environment microorganisms are interesting sources for this purpose, considering they harbor the ability to produce antibacterial molecules as products of their secondary metabolism. Hence, this study aimed to prospect bacteria from the environment which produces active molecules against other bacteria and describe these molecules in terms of stability and means of producing them. Initially, we characterized the phenotypes of 33 strains from a soil sample collected in secondary semi-deciduous forest in Londrina-PR, Brazil (23 ° 19'37,8 "S 51 ° 12'22,4" O). Among those, 100% were Gram positive, 67% were endospore-forming and 94% had bacilli morphology. Using only the bacilli observed to be endospore-forming, antagonist activity tests were performed in double culture against the pathological bacteria *Acinetobacter baumannii* (oxa23-positivo), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 8739. From these tests, we selected LABIM17 as the only strain capable of inhibit growing in all three markers, indicating ample spectrum of antibacterial activity. Molecular identification using rDNA 16S allowed us to classify LABIM17 as *Brevibacillus* sp. Submerged liquid fermentation was done to assess the extracellular antibacterial metabolites production by LABIM17. Results showed the production of such metabolites happen in MAK medium after 72h of incubation. Supernatant free of cells were exposed to different temperatures and light wavelengths ranging from UV to visible light in order to evaluate molecular stability. Results from this test indicated the metabolites were stable at temperatures below 70°C and at all light wavelengths tested. To further identify LABIM17 we follow-up our analysis with genome sequencing, allowing future deep genomic analysis in our lab and identifying LABIM17 as *Brevibacillus brevis*. Preliminary analysis of genic groups involved in the biosynthesis of molecules from secondary metabolism with antibacterial activity, we identified groups associated with production of Petrobactin, Octapeptin, Tirocidine, Gramicidin, Zwittermicin and Aurantinine. Taken together, our results suggests that *B. brevis* (LABIM17) is a potential candidate to source for antibacterial molecules, nevertheless more studies are needed to purify and characterize such molecules, as well as optimize its production using LABIM17 cultures.

Keywords: Natural antibiotics; secondary metabolism; bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Colônia de <i>Brevibacillus brevis</i> LABIM17 inibindo crescimento de <i>Fusarium solani</i>	17
Figura 2 – Fotomicrografia de <i>Brevibacillus brevis</i> LABIM 17. A) Colocação de Gram, 1000x; B) Endósporos, 1000x.....	17
Figura 3 – Eletromicrografia de varredura de <i>Brevibacillus brevis</i> LABIM 17 (40.000x).....	21
 ARTIGO 1	
Figura 1 – Resultado da Prospecção de bactérias pertencentes a biblioteca do Laboratório de Biotecnologia Microbiana.....	35
Figura 2 – Árvore filogenética reconstruída a partir da análise do gene do RNA ribossômico 16S do isolado LABIM 17.....	38
Figura 3 – Atividade antibacteriana do Sobrenadante Livre de Células de <i>Brevibacillus. brevis</i> LABIM 17 contra <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Staphilococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> por fermentação líquida submersa em meio ISP2.....	39
Figura 4 – Atividade antibacteriana do Sobrenadante Livre de Células de <i>Brevibacillus. brevis</i> LABIM 17 contra <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Staphilococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> por fermentação líquida submersa em meio MAK.....	40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Parâmetros para avaliação da termoestabilidade do sobrenadante livre de células.....	34
Tabela 2 – Parâmetros para avaliação da fotoestabilidade sobrenadante livre de células	34
Tabela 3 – Atividade antagonista de 34 isolados bacterianos contra <i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	37
Tabela 4 – Ensaio de foto e termoestabilidade	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UEL	Universidade Estadual de Londrina
LABIM	Laboratório de Biotecnologia Microbiana
ATCC	American type culture collection
spp.	espécie
UFC	Unidades formadoras de colônias
SLC	Sobrenadante livre de células
g	Força gravitacional
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
h	Horas
g	Gramas
L	Litro
°C	Graus Celsius
NaCl	Cloreto de sódio
µL	Microlitro
mL	Mililitro
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
LB	Luria Bertani
MH	Muller Hinton
UV-A	Ultravioleta A
UV-B	Ultravioleta B
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fd1	Foward 1
Rd	Reverse

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	14
3.	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1.	IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS.....	15
3.2.	O GÊNERO <i>BREVIBACILLUS</i>	16
3.3.	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO GÊNERO <i>BREVIBACILLUS</i>	18
3.4.	<i>BREVIBACILLUS BREVIS</i>	19
3.5.	PROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS	21
4.	REFERÊNCIAS	23
5.	ARTIGO 1:	30
6.	ARTIGO 2:	47
7.	CONCLUSÃO	52

1 1. INTRODUÇÃO

2 O estudo de antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos
3 (ANPM) iniciou-se no século XIX quando Louis Pasteur descreveu pela primeira vez
4 o antagonismo entre dois microrganismos, porém a busca por novas moléculas
5 bioativas nunca foi tão atual (de Oliveira et al., 2015).

6 Com o surgimento das “superbactérias” e a descrição de mecanismos
7 de resistência bacteriano contra diversos medicamentos disponíveis no mercado, a
8 busca por novos bioativos antimicrobianos tomou maiores proporções recebendo
9 atenção das principais agências de saúde, órgãos governamentais e instituições de
10 pesquisa e desenvolvimento do mundo todo (OMS, 2020).

11 Visando evitar uma crise provocada pela multirresistência a
12 antibióticos por bactérias com maior virulência a prospecção e exploração de novas
13 formas de obtenção de agentes potencialmente antimicrobianos se apresenta como
14 uma alternativa bastante promissora (JANKOSKI, 2018).

15 Um método que tem se mostrado bastante eficiente nesta busca é a
16 bioprospecção de bactérias ambientais presentes em diferentes microbiomas e que
17 sejam capazes de produzir moléculas com potencial antimicrobiano (MOURA et al.,
18 2021).

19 No quesito produção de bioativos com potencial antibacteriano, o filo
20 Firmicutes, mais especificamente o gênero *Brevibacillus* se destaca, pois, espécies
21 desse gênero, como *Brevibacillus brevis*, produzem peptídeos e outros metabólitos
22 secundários com atividade antimicrobiana, o que os torna um forte candidato a agente
23 de biocontrole (PANDA, et al., 2014).

24 Neste sentido, essa espécie apresenta grande potencial devido a sua
25 diversidade genética e produção de moléculas com atividade antimicrobiana e,
26 portanto, este estudo se dedicará a explorar esse potencial.

27

28

29

1 2. OBJETIVOS

2 2.1. OBJETIVO GERAL

3 Prospecção e identificação molecular de bactéria produtora de
4 metabólitos extracelulares com atividade antibiótica contra patógenos de humanos.

5

6 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7 • Prospecção e caracterização de bactérias produtoras de antibióticos
8 extracelulares;
- 9 • Classificação taxonômica a nível de gênero da bactéria produtora de
10 antibióticos mais promissora;
- 11 • Estudo de parâmetros básicos de fermentação líquida submersa para produção
12 dos antibióticos extracelulares;
- 13 • Estudo de termo e fotoestabilidade dos metabólitos antibióticos;
- 14 • Análise do sequenciamento completo do genoma do melhor isolado bacteriano
15 produtor de antibióticos extracelulares.

1 3. REVISÃO DA LITERATURA

2 3.1. IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS

3
4 A resistência aos antibióticos é uma ameaça urgente à saúde pública
5 que tem recebido atenção substancial das principais agências de saúde do mundo e
6 de órgãos governamentais nacionais. Os antibióticos – substâncias naturais que
7 atuam inibindo o crescimento ou causando a morte de microrganismos-
8 revolucionaram a medicina moderna. Isso resultou em maior expectativa de vida em
9 todo o mundo (SINHA & KESSELHEIM, 2016). No entanto, a eficácia de muitos
10 antibióticos está diminuindo à medida que as bactérias estão se tornando cada vez
11 mais resistentes aos antibióticos comerciais, como resultado da evolução natural, e
12 em grande parte, também devido ao uso inadequado (BARAKA et al., 2019).

13 Recentemente, o fenômeno de seleção de bactérias resistentes
14 tomou maiores proporções, ao serem descobertas variáveis bacterianas que
15 apresentavam mecanismos de resistências contra diversos tipos de antimicrobianos
16 presentes no mercado farmacológico (LAU et al., 2017). Os indivíduos resistentes a
17 esses antimicrobianos passaram a ser chamados, popularmente, de “superbactérias”
18 (SILVA; AQUINO, 2018) e esta temática se tornou objeto de discussões na
19 Organização Mundial de Saúde – OMS (OMS, 2020).

20 Outra preocupação que contribui para agravar este cenário, é que os
21 antibióticos empregados hoje, em sua maioria, pertencem as mesmas classes
22 descobertas a mais de 40 anos, são derivados semi ou sintéticos correspondendo a
23 novas gerações como no caso das Cefalosporinas (SALAMONI, 2009).

24 Por ser uma questão de saúde pública, a indústria farmacêutica e os
25 institutos de pesquisa têm somado esforços para a investigação de novas moléculas
26 com potencial antimicrobiano (SILVA; AQUINO, 2018). E voltado suas atenções para
27 a natureza e a busca por bioativos de origem natural (de OLIVEIRA, et al, 2015).

28 Porém, por mais que tenhamos esforços concentrados, a busca por
29 moléculas antimicrobianas é uma longa estrada e envolve, por vezes, a
30 bioprospecção, que trata de investigar a biodiversidade de determinado local. Tem
31 sido comum pesquisas que envolvem a bioprospecção para analisarem a microbiota
32 de diferentes solos, água e de fontes biológicas em busca de microrganismos capazes
33 de produzir moléculas com potencial antimicrobiano (MOURA et al., 2021).

1 Nesta busca, contamos com uma natureza riquíssima capaz de
2 produzir uma incrível variedade de metabólitos secundários de peso molecular inferior
3 a 2.500 Da com atividade antimicrobiana (ROESSNER & SCOTT, 1996).
4 Considerando este incrível reservatório, muitos pesquisadores têm se dedicado aos
5 estudos destes compostos naturais produzidos especificamente por bactérias.

6 Dentre os mais diferentes bioativos produzidos por bactérias, os
7 antibióticos possuem grande interesse para atender a demanda da sociedade por
8 novas terapias. Várias espécies de bactérias são produtoras de antibióticos, no
9 entanto, alguns grupos estão em destaques: actinobactérias (por exemplo,
10 *Streptomyces* e *Actinomyces*) Proteobacterias (por exemplo (*Pseudomonas*) e
11 Firmicutes (por exemplo *Bacillus* e *Brevibacillus*) (DEMAIN, 1999; KILLHAM &
12 PROSSER, 2007).

13 Um representante de destaque do filo Firmicutes é o gênero
14 *Brevibacillus*, pois além de sua grande capacidade adaptativa, ou seja, é encontrado
15 em diferentes habitats, as espécies desse gênero produzem peptídeos e outros
16 metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, o que os torna um forte
17 candidato a agente de biocontrole (PANDA, et al., 2014).

18 19 3.2. O GÊNERO *BREVIBACILLUS*

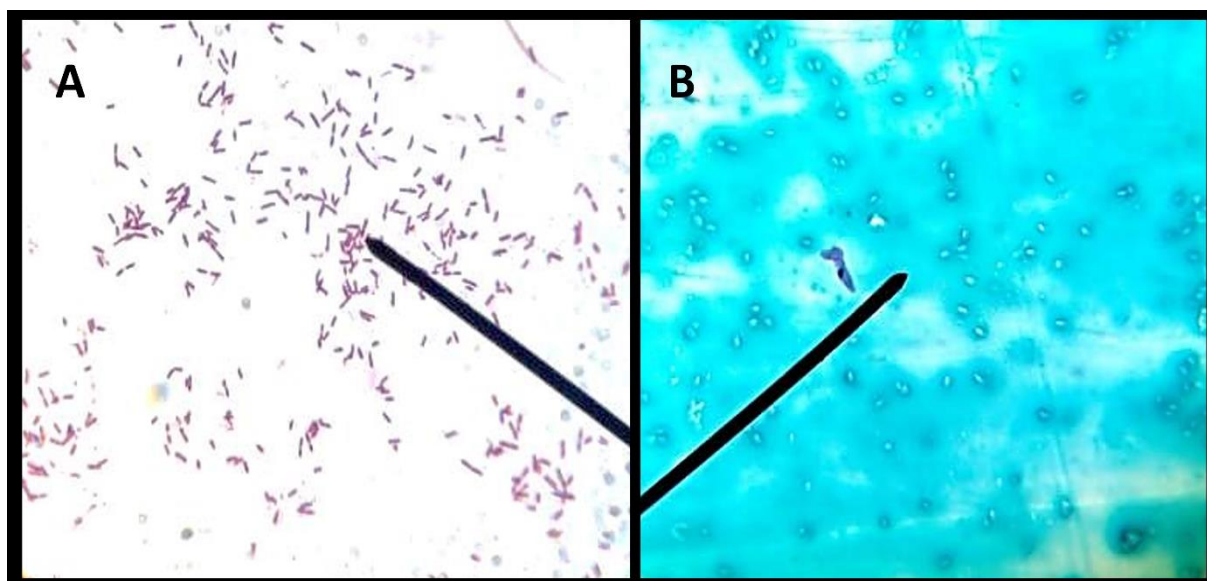
20
21 As espécies do gênero *Brevibacillus* possuem uma alta habilidade
22 adaptativa, sendo encontradas em diversos habitats, incluindo ambientes sob
23 condições extremas, como na Antártida (LOGAN et al., 2009; DE-VOS, 2009; BENDIA
24 et al., 2018). Devido a essa adaptação a diferentes ambientes, espécies deste gênero
25 possuem aplicações biotecnológicas variadas, tais como: fonte de enzimas capazes
26 de biodegradar polietileno de baixa densidade, capacidade de atuar como candidato
27 a agente de biocontrole, produção peptídeos de baixo peso molecular e outros
28 metabólitos secundários de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas
29 (PANDA et al., 2014).

30 A maioria das espécies de *Brevibacillus* pode crescer aerobiamente
31 em meio padrão e produzir colônias achatadas, secas, lisas ou rugosas, cinza-
32 amareladas ou âmbar (Figura 1) e são difíceis de identificar com base em ensaios
33 fenotípicos de rotina (HATAYAMA et al. 2014).



1
2 **Figura 1.** Colônia de *Brevibacillus brevis* LABIM17 inibindo crescimento de *Fusarium*
3 *solani*. Foto: Rosiana Bertê, 2018.

4
5
6 Este gênero possui uma coleção fenotipicamente grande e diversa
7 com uma alta heterogeneidade filogenética e vem sofrendo intensa reclassificação por
8 conta dos avanços na biologia molecular (JOHNSON & DUNLAP, 2019). São
9 bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis em forma de bastonete com dimensões
10 inferiores a 10 micrômetros e formadoras de endósporos (Figura 2). Sua mobilidade é
11 através de flagelos peritricos e elipsoidais (NAZINA, 2001).



13
14 **Figura 2.** Fotomicrografia de *Brevibacillus brevis* LABIM 17. A) Colocação de Gram,
15 1000x; B) Endósporos, 1000x. Foto Mirela Mosela, 2019

1
2 A etiologia da nomenclatura do gênero *Brevibacillus* remete à curto
3 bastão ou pequena haste e foi originalmente proposto com base em sequências do
4 gene 16S rRNA de 11 espécies pertencentes aos grupos *Bacillus brevis* e *Bacillus*
5 *aneurinolyticus* (SHIDA et al. 1996).

6 Atualmente, o gênero inclui 28 espécies com nomes publicados de
7 forma válida: *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus aydinogluensis*, *Brevibacillus*
8 *borstelensis*, *Brevibacillus brevis*; *Brevibacillus centrosporus*, *Brevibacillus*
9 *choshinensis*, *Brevibacillus composti*, *Brevibacillus fluminis*, *Brevibacillus formosus*,
10 *Brevibacillus fortis*, *Brevibacillus fulvus*, *Brevibacillus gelatini*, *Brevibacillus*
11 *ginsengisoli*, *Brevibacillus halotolerans*, *Brevibacillus invocatus*, *Brevibacillus*
12 *laterosporus*, *Brevibacillus levickii*, *Brevibacillus limnophilus*, *Brevibacillus*
13 *massiliensis*, *Brevibacillus migulae*, *Brevibacillus nitrificans*, *Brevibacillus panacihumi*,
14 *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus porteri*, *Brevibacillus reuszeri*, *Brevibacillus*
15 *schisleri*, *Brevibacillus sediminis* e *Brevibacillus thermoruber* (LPSN, 2021).

16 17 18 3.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO GÊNERO *BREVIBACILLUS*

19
20 Existem várias espécies do gênero *Brevibacillus* com importância
21 biotecnológica. Podemos destacar *B. choshinensis* HPD31 como produtora eficiente
22 de fator de crescimento humano recombinante (MIYAUCHI et al. 1999); *B.*
23 *laterosporus*, frequentemente associada a atividade entomopatogênica (RUIU, et al,
24 2013) e, mais recentemente, *B. halotolerans*, também foi associado ao controle
25 biológico de insetos (KATAK, 2020).

26 Além destas espécies citadas anteriormente, *B. brevis*, possui
27 destaque dentro do gênero, uma vez que, são amplamente estudadas e exploradas
28 industrialmente principalmente pela sua vasta capacidade metabólica e pela
29 diversidade estrutural dos metabólitos com potencial antimicrobianos (SONG et al.,
30 2012).

31 Dentre os diferentes metabólitos produzidos por linhagens desta
32 espécie, destacam-se a Gramicidina (MOGI; KITA, 2009). A Gramicidina é um
33 peptídeo cíclico antimicrobiano muito utilizado para fabricação de formulações
34 farmacêuticas e foi descoberta na década de 40 na União Soviética produzido por um

1 isolado de *B. brevis* (GAUSE & BRAZHNIKOVA, 1944). Em formulações
2 farmacêuticas, a gramicidina esta frequentemente associadas à nistatina, ao sulfato
3 de neomicina e ao acetono de triancinolona. Tal associação é comercializada sob a
4 forma de creme ou pomada.

5 Outro estudo com um isolado do solo do Monte Tai, na China, *B.*
6 *brevis* XDH, demonstrou ação inibitória de agentes patogênicos tanto *in vivo* quanto
7 *in vitro* (SONG et al., 2012). Neste estudo os autores descobriram que *B. brevis* XDH
8 produz um novo antibacteriano peptídico identificado como Tostadin.

9 Outros registros demonstram que diferentes cepas de *B. brevis* são
10 capazes de produzir substâncias com atividades antimicrobianas para controle de
11 diferentes patógenos de humanos ou de plantas (HAGGAG, 2008; SACHIN et al.,
12 2006; CHANDEL et al., 2010; JIANMEI et al., 2015; ZHENG et al., 2006; HAO et al.,
13 2007).

14 Essa habilidade de produzir diferentes tipos de metabólitos bioativos
15 está relacionada principalmente com a sua diversidade genética (LEE et al., 2014) e,
16 neste sentido, espécies do gênero *Brevibacillus* são ótimos agentes biológicos para
17 estudo e exploração comercial para formulações farmacêuticas, produtos de
18 aplicações agrícolas e / ou produção de enzimas com importância industrial
19 (SANJIVKUMAR et al., 2013).

20

21 3.4. *BREVIBACILLUS BREVIS*

22 *Brevibacillus brevis* é uma bactéria aeróbia, Gram positiva (Figura
23 2A), formadora de esporos (Figura 2B) e com formato de bastonete (Figura 3).
24 Comumente é encontrada no solo, na água e em matéria em decomposição (SHIDA
25 et al., 1996). Embora seja incomum, há relatos de linhagens de *B. brevis* causando
26 doenças infecciosas (PARMAR, et al., 2020).

27 A primeira descrição do *Bacillus brevis*, atualmente *Brevibacillus*
28 *brevis*, foi realizado por Migula (1900), esse binômio identificava o que anteriormente
29 Flugge (1894) designou como "*Bacillus lactic* I". Devido à perda das cepas
30 originalmente identificadas como *B. brevis*, a difusão de cepas utilizadas atualmente
31 é oriunda de três linhagens que foram isoladas por Ford em 1916, o qual as identificou
32 como *B. brevis* baseado nas características morfológicas descritas anteriormente
33 (FORD, 1916).

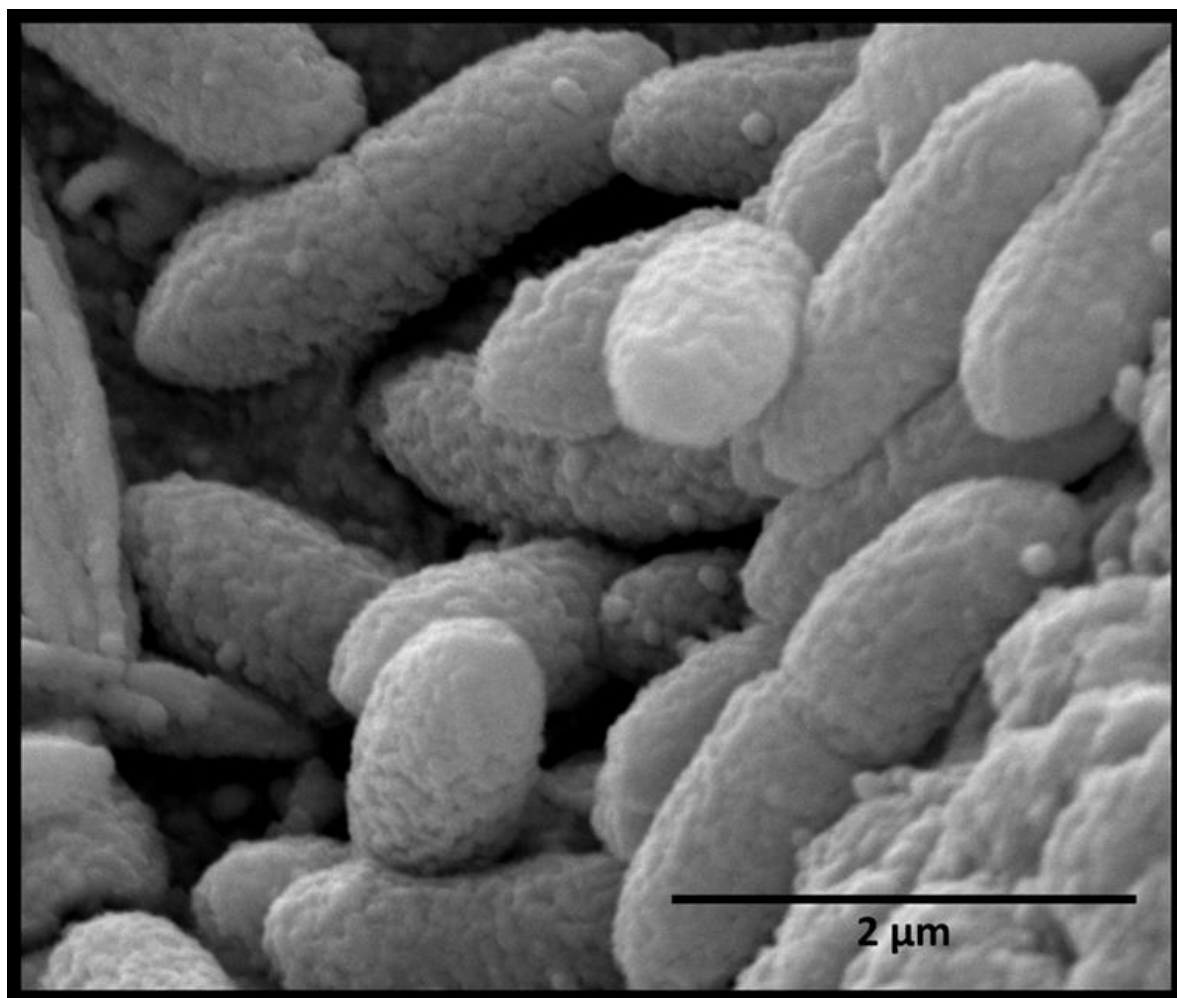
34 De acordo com Nakamura (1991), o interesse em se estudar o *B.*

1 *brevis* teve início com a descoberta de que algumas cepas que eram capazes de
2 produzir o antibiótico gramicidina (GAUSE; BRAZHNIKOVA, 1944). Além disso, foram
3 descritos em estudos posteriores o potencial de moluscicida de algumas cepas de *B.*
4 *brevis* (GORDON, et al 1973), bem como a atividade desses organismos na
5 hiperprodução proteica (UDAKA, et al., 1989). Outro fator de interesse no estudo
6 dessa bactéria e a suscetibilidade deste organismo a manipulação genética que
7 objetiva a produção de proteínas externas de interesse biotecnológico, que se torna
8 possível devido à baixa produção de proteinases (UDAKA, et al., 1989).

9 Além dos compostos já citados, nos chama a atenção a sua habilidade
10 de produzir diferentes tipos de gramicidina e diferentes tipos de substâncias
11 extracelulares que apresentaram potencial inibitório de outras bactérias (CHE et al.
12 2015; SONG et al. 2012; YANG; YOUSEF, 2018), de fungos (EDWARDS; SEDDON,
13 2001; JIANG et al., 2015; JOO et al., 2015), além da atividade patogênica contra
14 invertebrados (PESSANHA et al., 2015; RUIU, 2013), que podem contribuir com o
15 controle biológico de doenças tanto agricultura como em animais.

16 Com o crescente interesse no estudo de *B. brevis*, outras cepas foram
17 sendo isoladas, o que promoveu um amplo conhecimento deste grupo, como por
18 exemplo, fenótipos, tipos de nutrientes e temperatura ideal para o crescimento, que
19 está associada a heterogeneidade fenotípica desta espécie (PRIEST; ALEXANDER,
20 1988).

21



1
2 **Figura 3.** Eletromicrografia de varredura de *Brevibacillus brevis* LABIM 17 (40.000x).
3
4

5 3.5. PROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS 6

7 Muitos microrganismos produzem metabólitos secundários com
8 potencial aplicação em diversas áreas. Esses metabólitos secundários constituem
9 uma fonte para o desenvolvimento de produtos biológicos para o controle de doenças
10 em plantas ou novos antibióticos para o controle de doenças em humanos e / ou outras
11 aplicações industriais (PHAM et al., 2019).

12 A síntese de moléculas antimicrobianas geralmente está associada
13 ao metabolismo secundário. Em bactérias, a produção destes metabólitos
14 secundários se dá por diferenciação de metabolismo que ocorre quando há uma
15 mudança nas atividades bacterianas daquelas associadas ao crescimento vegetativo
16 (metabolismo primário). Este fenômeno está particularmente associado à privação

1 celular, durante a qual os componentes intracelulares são frequentemente
2 transportados e ressintetizados em novos compostos (podendo ser antibióticos) por
3 meio do metabolismo secundário (isto é, não ligado ao crescimento vegetativo)
4 (SEYEDSAYAMDOST, 2019).

5 Desta forma, dado a riqueza molecular e funcional desses metabólitos
6 secundários, bem como o potencial antimicrobiano de moléculas sintetizadas nessas
7 condições (PURVES et al., 2016), justifica cada vez mais estudos focados em
8 descobrir novas moléculas antibióticas.

9 Um dos principais estudos é a bioprospecção de agentes biológicos
10 ou moléculas bioativas. A prospecção de bactérias e fungos de solo demanda grande
11 esforço e conhecimento, uma vez que, no solo há grande diversidade de organismos
12 e pode variar de acordo com as condições ambientais da amostra coletada, como a
13 porosidade do solo, a composição, a disponibilidade água e nutrientes, entre outros
14 (ARASU et al., 2009).

15 Essas bactérias do solo e fungos apresentam grande quantidade de
16 metabólitos secundários, bem como uma imensa diversidade dessas moléculas, que
17 podem possuir diferentes funções biológicas (BERVANAKIS, 2008). Dentre os
18 metabólitos, podemos destacar os peptídeos, carboidratos, terpenoides, alcaloides,
19 esteroides, lipídeos e policetídeos (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

20 Após o isolamento dos agentes biológicos produtores de antibióticos,
21 atualmente muitas pesquisas ainda são concentradas em métodos tradicionais de
22 isolamento e purificação, com inúmeras análises químicas e biológicas. No entanto,
23 os avanços nas tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS)
24 ofereceram uma plataforma para a análise pan-genômica de microrganismos da
25 comunidade e da linhagem ao nível do gene (MAGHEMBE et al., 2020). Essa
26 estratégia em conjunto com os métodos clássicos de isolamento de bactérias
27 produtoras de bioativos, pode acelerar o desenvolvimento de tecnologias
28 microbiológicas e aumentar nossa compreensão dos atributos moleculares e
29 bioquímicos dos microrganismos em estudo.

30 Em antecipação a futuras análises em profundidade de purificação de
31 metabólitos antibióticos, análises genômica e suas aplicações potenciais,
32 apresentamos aqui um estudo de prospecção de bactérias produtoras de antibióticos,
33 estudo de parâmetros de produção e estabilidade dos metabólitos antibióticos e dados
34 genômicos de um isolado de *Brevibacillus brevis* LABIM17.

1 4. REFERÊNCIAS

- 2 ARASU, et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from
3 Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale*, [S.L.], v. 19, n. 1, p.
4 22-28, 2009.
- 5
- 6 BARAKA, et al. Health care providers' perceptions regarding antimicrobial
7 stewardship programs (AMS) implementation-facilitators and challenges: a cross-
8 sectional study in the Eastern province of Saudi Arabia. *Annals of Clinical
9 Microbiology and Antimicrobials*. v 24. set. 2009.
- 10
- 11 BENDIA, et al. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from
12 deception island volcano, antarctica. *Extremophiles*, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 917-929,
13 2018.
- 14
- 15 BERVANAKIS, G. Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria.
16 2008. 188 f. Dissertação (Mestrado em Applied Biology) - Department of Medical
17 Biotechnology, Flinders University, Adelaide, 2008.
- 18
- 19 CHANDEL, et al.. Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on
20 Tomato by *Brevibacillus brevis*. *Journal of Phytopathology*, [S.L.], v. 158, n. 7-8, p.
21 470-478, 2009.
- 22
- 23 CHE, et al. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease
24 of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX.
25 *Crop Protection*, [S.L.], v. 67, p. 178-183, 2015.
- 26
- 27 DEMAIN, A. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms.
28 *Applied Microbiology Biotechnology*. v 52. p 455–463. mai. 1999.
- 29
- 30 DE-VOS, P. Genus IV. *Brevibacillus* Shida, Takagi, Kadowaki and Komagata 1996a,
31 942VP. In: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. (ed.). *Bergey's manual of
32 systematic bacteriology* (2^a ed.). New York: Springer, 2009. p. 305–316.
- 33
- 34 DIAS, et al. Bioprospecção de Microorganismos de Interesse Biotecnológico Isolados

- 1 em Ecosystema de Manguezal. Revista de Investigação Biomédica, [S.L.], v. 9, n. 1,
2 p. 24-30, 2017.
- 3
- 4 EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against
5 *Botrytis cinerea* in vitro. Journal of Applied Microbiology, [S.L.], v. 91, n. 4, p. 652-
6 659, 2001.
- 7
- 8 FLÜGGE, C. A. R. L. Die Aufgaben und Leistungen der Milchsterilisierung gegenüber
9 den Darmkrankheiten der Säuglinge. Zeitschrift für Hygiene und
10 Infektionskrankheiten, v. 17, n. 1, p. 272-342, 1894.
- 11
- 12 FORD, W. W. Miscellaneous Cultures. Journal of bacteriology, v. 1, n. 5, p. 518-526,
13 1916.
- 14
- 15 GAUSE, G. F. BRAZHNIKOVA, M. G. Gramicidin S: Origin and Mode of Action.
16 Lancet, p. 715-716, 1944.
- 17
- 18 GORDON, et al. The genus bacillus. Washington: Agricultural research service, US
19 Department of Agriculture, 1973.
- 20
- 21 HAGGAG, W. M. Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and
22 *Bacillus polymyxa* against *Botrytis* grey mould in strawberry. Archives of
23 Phytopathology and Plant Protection, [S.L.], v. 41, n. 7, p. 477-491, 2008.
- 24
- 25 HAO, et al. The characteristics research of antibacterial material of *Brevibacillus*
26 *brevis* JK-2. J. Zhejiang Univ. Agriculture and Life Science Edition, [S.L.], v. 33, p.
27 484-489, 2007.
- 28
- 29 HATAYAMA, et al. *Brevibacillus fulvus* sp. nov. isolated from compost pile.
30 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v 64. fev. 2014.
- 31
- 32 JANKOSKI, P. R. Prospecção de isolados bacterianos de áreas úmidas quanto à
33 produção de novas moléculas com atividade antimicrobiana. 2018. 60 f. Dissertação
34 (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas

1 da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

2

3 JIANG, et al. Antifungal activity of *Brevibacillus laterosporus* JX-5 and
4 characterization of its antifungal components. *World Journal of Microbiology and*
5 *Biotechnology*, [S.L.], v. 31, n. 10, p. 1605-1618, 2015.

6

7 JIANMEI, et al. Identification of ethylparaben as the antimicrobial substance
8 produced by *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Microbiological Research*, [S.L.],
9 v. 172, p. 48-56, 2015.

10

11 JOHNSON, E. T., DUNLAP, C. A. Phylogenomic analysis of the *Brevibacillus brevis*
12 clade: a proposal for three new *Brevibacillus species*, *Brevibacillus fortis* sp. nov.,
13 *Brevibacillus porteri* sp. nov. and *Brevibacillus schisleri* sp. nov. *Antonie van*
14 *Leeuwenhoek*, v 112. p. 991–999. jan, 2019

15

16 JOO, et al. *Brevibacillus* sp. antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *Biological*
17 *Control*, [S.L.], v. 87, p. 64-70, 2015.

18

19 KATAK, R. M. Análises moleculares de linhagens de *Bacillus* e *Brevibacillus* spp.,
20 isolados da Amazônia brasileira, ativas contra *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. 2020.
21 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas,
22 Manaus, 2020.

23

24 KILLHAM, K., PROSSER, J.. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. The*
25 *Prokariotes*. Academic Press. v 3. cap 5. p 119-144, 2007.

26

27 LAU, et al. Surveillance of life-long antibiotics: a review of antibiotic prescribing
28 practices in an australian healthcare network. *Annals Of Clinical Microbiology And*
29 *Antimicrobials*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-4, 18 jan. 2017.

30

31 LEE, et al. Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from
32 Tropical Mangrove Sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal*, [S.L.], v.
33 2014, p. 1-14, 2014.

34

- 1 LOGAN, et al. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic,
2 endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
3 *Microbiology*, [S.L.], v. 59, n. 8, p. 2114-2121, 2009
4
- 5 LPSN - LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE
6 (Genus *Brevibacillus*. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature,
7 2020. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/brevibacillus>>. Acesso em: 29,
8 dez. 2021.
9
- 10 MAGHEMBE, et al. Omics for Bioprospecting and Drug Discovery from Bacteria and
11 Microalgae. *Antibiotics* (Basel). 2020.
12
- 13 MIYAUCHI, A.; OZAWA, M.; MIZUKAMI, M.; YASHIRO, K.; EBISU, S.; TOJO, T.;
14 FUJII, T.; TAKAGI, H. Structural conversion from non-native to native form of
15 recombinant human epidermal growth factor by *Brevibacillus choshinensis*. *Biosci*
16 *Biotechnol Biochem*. Nov;63(11):1965-9. 1999.
17
- 18 MIGULA, W. *System der Bakterien*. Jena: Gustav Fischer, 1900. v. 2, p. 135.
19
- 20 MOGI, T.; KITA, K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide
21 antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [S.L.], v. 66, n. 23, p. 3821-3826,
22 2009.
23
- 24 MOURA, et al. Avaliação antimicrobiana das bactérias, isolada do solo do igarapé do
25 quarenta de Manaus-AM. *Brazilian Journal Of Development*, Curitiba, v. 7, n. 5, p.
26 50002-50012, 2021.
27
- 28 NAZINA, et. al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of
29 *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov.
30 from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus*
31 *thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus*
32 *thermoglucoasidarius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new
33 combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G.*
34 *kaustophilus*, *G. thermoglucoasidarius* and *G. thermodenitrificans* *International*

- 1 Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 50. p 433-446. 2001
2
- 3 O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary
4 metabolism. Current Opinion In Biotechnology, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.
5
- 6 De OLIVEIRA, et al. Tópicos Especiais em Microbiologia. Londrina: livro eletrônico,
7 2015. p 180 – 199.
8
- 9 OLIVEIRA, et al. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its
10 Potential Use in Biological Control. Applied and Environmental Microbiology, [S.L.], v.
11 70, n. 11, p. 6657-6664, 2004.
12
- 13 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Antimicrobial resistance. World
14 Health Organization, 2020. Disponível em: < [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)
15 [sheets/detail/antimicrobial-resistance](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)>. Acesso em: 21, set. 2021.
16
- 17 PANDA, et al. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. Antonie van
18 Leeuwenhoek. V105, p 623 – 639. fev. 2014
19
- 20 PARMAR, et al. A Case of *Brevibacillus brevis* Meningitis and Bacteremia. Case
21 Reports in Infectious Diseases, [S.L.], v. 2020, p. 1-2, 202, 2020.
22
- 23 PESSANHA, et al. Evaluation of larvicidal activity and effects on post embryonic
24 development of laboratory reared *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera:
25 Calliphoridae), treated with *Brevibacillus laterosporus*. Journal of Invertebrate
26 Pathology, [S.L.], v. 128, p. 44-46, 2015.
27
- 28 PHAM, et al. “A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and
29 Biologics.” *Frontiers in Microbiology* . v. 10. p 1 – 27. Jun, 2019.
30
- 31 PRIEST, F. G.; ALEXANDER, B. A Frequency Matrix for Probabilistic Identification of
32 Some Bacilli. *Microbiology*, [S.L.], v. 134, n. 11, p. 3011-3018, 1988.
33
- 34 PURVES, et al. Using Molecular Networking for Microbial Secondary Metabolite

- 1 Bioprospecting. *Metabolites*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 2, 2016.
- 2
- 3 ROESSNER, C. A, SCOOT, A. I. Achieving natural product synthesis and diversity
4 via catalytic networking ex vivo. *Chemistry and Biology*. v. 3. p. 325 -330. mai. 1996.
- 5
- 6 RUIU, L. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-
7 Spectrum Antimicrobial Species. *Insects*, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 476-492, 2013.
- 8
- 9 RUIU, et al. Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management.
10 *Bulletin of Insectology*, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 181-186, 2013.
- 11
- 12 SACHIN, et al. Evaluation of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus firmus* Strains in
13 Mangement of Fungal Pathogens. *Pesticide Research Journal*, [S.L.], v. 18, n. 2, p.
14 159-161, 2006.
- 15
- 16 SALOMANI, S. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de asolados de
17 *Streptomyces* e estudo de moléculas bioativas. 2009. 150 f. Tese. (Doutorado em
18 Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Instituto de Ciências Básicas e da Saúde.
19 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS.
- 20
- 21 SALAMONI, et al. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species
22 isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World Journal of*
23 *Microbiology and Biotechnology*, [S.L.], v. 26, n. 10, p. 1847-1856, 2010.
- 24
- 25 SANJIVKUMAR, et al. Magnesite ore soil actinobactaria: a source for novel enzymes
26 and antibiotics. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, S.L., v. 3, n. 4,
27 p. 3401-3419, 2013.
- 28
- 29 SEYEDSAYAMDOST, M. R. Toward a global picture of bacterial secondary
30 metabolism. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 3-4, p.
31 301–311, 2019.
- 32
- 33 SHIDA, et al. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and
34 *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, [S.L.], v.

- 1 46, n. 4, p. 939-946, 1996.
2
- 3 SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos
4 desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Revista de Epidemiologia e*
5 *Controle de Infecção*, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.
6
- 7 SINHA, M. S.; KESSELHEIM, A. S. Regulatory incentives for antibiotic drug
8 development: a review of recent proposals. *Bioorganic Med Chemistry*. v 24. p 6446-
9 6451. Dez. 2016
10
- 11 SONG, et al. Tostadin, a novel antibacterial peptide from an antagonistic
12 microorganism *Brevibacillus brevis* XDH. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 111, p.
13 504-506, 2012.
14
- 15 UDAKA, S.; TSUKAGOSHI, N.; YAMAGATA, H. *Bacillus brevis*, a Host Bacterium for
16 Efficient Extracellular Production of Useful Proteins. *Biotechnology and Genetic*
17 *Engineering Reviews*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 113-146, 1989.
18
- 19 YANG, X.; YOUSEF, A. E. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.:
20 structure, classification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and*
21 *Biotechnology*, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 34-57, 2018.
22
- 23 ZHENG, et al. The molecular identification of biocontrol bacteria BS-2000 and JK-2
24 preventing melons *Fusarium* wilt. *Fujian J. Agric. Sci*, v. 21, p. 154-157, 2006.
25

1 **5. ARTIGO 1: PROSPECÇÃO DE CEPAS ANTAGÔNICAS ISOLADAS EM SOLO DE**
2 **UM FRAGMENTO DE FLORESTA SECUNDÁRIA SEMIDECÍDUA CONTRA**
3 **BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

4

5 **INTRODUÇÃO**

6 A resistência aos antibióticos é uma ameaça urgente à saúde pública
7 que tem recebido atenção substancial das principais agências de saúde do mundo e
8 de órgãos governamentais nacionais. Os antibióticos – substâncias naturais que
9 atuam inibindo o crescimento ou causando a morte de microrganismos-
10 revolucionaram a medicina moderna (SINHA & KESSELHEIM, 2016). No entanto, a
11 eficácia de muitos antibióticos está diminuindo à medida que as bactérias estão se
12 tornando cada vez mais resistentes aos antibióticos comerciais, como resultado da
13 evolução natural, e em grande parte, também devido ao uso inadequado (BARAKA et
14 al., 2019).

15 Aliado a essa resistência adquirida por populações de
16 microrganismos, nas últimas duas décadas observou-se um decaimento do número
17 de pesquisas que se propunham a investigar novos antimicrobianos, sendo que
18 durante o período de 2007 a 2015 apenas um novo antimicrobiano natural produzido
19 por microrganismos (ANPM) foi aprovado, no caso, a Teixobactina (de Oliveira et al.,
20 2015).

21 Essa redução do fluxo de novos antibióticos promoveu, recentemente,
22 um interesse das indústrias farmacêuticas em microrganismos com produção de
23 compostos antimicrobianos e com potencial aplicação farmacológica (de Oliveira et
24 al., 2015). A procura por moléculas antimicrobianas se inicia pela bioprospecção, que
25 consiste em investigar a biodiversidade de determinado local como diferentes tipos de
26 solos, água, vegetações e condições climáticas em busca de microrganismos com
27 potencial biotecnológico capazes de produzir compostos bioativos envolvidos em
28 diferentes aplicações, especialmente os antimicrobianos (MOURA, et al, 2021).

29 Sendo assim, este estudo objetivou prospectar bactérias produtoras
30 de metabólitos secundários com potencial ação antibacteriana, a partir de isolados de
31 bactérias coletadas do solo na região sul do Brasil

32

33

1 **METODOLOGIA**

2 *Cepas microbianas*

3 *Bactérias patogênicas*

4 Todos os ensaios antibacterianos foram realizados contra cepas de
5 referência da *American Type Culture Collection* (ATCC), *Staphylococcus aureus*
6 ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 8739 e um isolado clínico de *Acinetobacter*
7 *baumannii* (isolado OXA-23-positivo) gentilmente cedida pela Profa. Dra. Floristher
8 Elaine Carrara Marrone da coleção de microrganismos do Laboratório de
9 Microbiologia do Ambulatório do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de
10 Londrina, Paraná, Brasil. Todas as cepas bacterianas foram armazenadas a – 80°C
11 em meio caldo TS (Tryptic soy - Acumedia, Michigan) contendo 20% de glicerol no
12 Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) da Universidade Estadual de
13 Londrina, Paraná, Brasil.

14

15 *Bactérias antagonistas*

16 Para prospecção de atividade antagônica foram selecionadas 33
17 bactérias da biblioteca do LABIM isoladas em solo de um fragmento de floresta
18 secundária semidecídua em Londrina-PR, Brasil (23 ° 19'37,8 "S 51 ° 12'22,4" O).
19 Todas os isolados foram avaliados quanto ao tipo de parede por coloração de Gram
20 (kit coloração de Gram, KASVI) e endósporos por coloração de Wirtz –Conklin. O
21 cultivo se deu através da técnica de estrias contínuas e foi realizado em triplicata.

22

23 *Antagonismo direto por cultura-dupla*

24 Os 22 isolados gram – positivos e capazes de produzir endósporos
25 foram cultivados em meio Luria Bertani (LB) Ágar (g/L: triptona: 10,0; extrato de
26 levedura: 5,0; cloreto de sódio: 5,0; ágar 1,5%, pH: 7,0± 0,2 a 25°C) em quatro pontos
27 equidistantes a 28°C por 24h.

28

29 *A. baumannii*, *S. aureus* e *E. coli* foram utilizados como indicadores a
30 fim de se observar a atividade antagônica. Para preparo dos inóculos foram utilizados
31 de 3 a 5 colônias de cada bactéria e suspensas em solução salina (0,85% NaCl) e
32 ajustadas em densidade celular equivalente ao tubo 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$
33 UFC/mL). Para o ensaio, foram transferidos 50 µL para 10 mL de meio LB soft a 45°
34 C (0,85% de ágar bacteriológico) separadamente, homogeneizado e vertido nas
placas de Petri contendo os isolados antagonistas cultivados. Tão logo solidificadas,

1 as placas foram incubadas a 37 °C por 24h e então avaliado a sua atividade inibitória.
2 Todos os testes foram realizados em triplicata. Para fins de classificação, as zonas de
3 inibição foram medidas e plotadas em milímetros (mm) e a atividade inibitória foi
4 classificada em: inexistente (0 mm), baixa (<10 mm), moderada (11-20 mm) e alta
5 (>20 mm).

6

7 *Identificação molecular*

8 O isolado com maior atividade inibitória pelo método de cultura dupla,
9 foi submetido a identificação molecular da espécie com uso do rDNA 16S. A sequência
10 foi obtida pela extração do DNA genômico total utilizando kit de extração PureLink™
11 Microbiome DNA Purification kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham,
12 Massachusetts, USA). Integridade do DNA foi verificada por gel de agarose 1% e
13 foi quantificado por espectrometria em NanoDrop 2000/2000c (ThermoFisher
14 Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Para amplificação do gene ribossomal 16S
15 primers específicos com as seguintes sequenciais foram utilizados: Fd1
16 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' e Rd 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3',
17 descrito por Weisburg et al (1991). As condições utilizadas para a reação de
18 sequenciamento seguiram as indicações do fabricante (Applied Biosystems,
19 California-USA) e metodologia descrita por Weisburg e colaboradores (1991). As
20 chamadas de bases foram feitas usando o programa Mesquite (Maddison & Maddison,
21 2007) com o pacote phred/phrap (Ewing et al., 1998). A sequência consenso foi obtida
22 e alinhada utilizando o algoritmo MUSCLE com outras 8 sequencias de rDNA de
23 *Brevibacillus* disponíveis publicamente no banco de dados GenBank/NCBI. Para
24 escolha do melhor modelo de substituição para o alinhamento, PAUP e MrModelTest2
25 (Nylander, 2008) foram utilizados. Duas corridas independentes foram realizadas com
26 o Beast2 (Bouckaert et al., 2014) no portal CIPRES (Miller et al., 2010). Arquivos das
27 duas corridas foram combinados usando Tracer (Rambaut et al., 2018) para
28 checagem de convergência e dados, ambos os arquivos foram combinados com
29 LogCombiner v1.5.3 com um valor de burn-in de 10%. A melhor arvore foi selecionada
30 com Tree Annotator. Para visualização da arvore foi utilizado o SplitsTree4 (Huson &
31 Bryant, 2005).

32

33 *Produção de metabólitos antibacterianos em diferentes meios de cultura*

34 *Preparo do inóculo*

1 Para o preparo do pré-inóculo, de 3 a 5 colônias foram suspensas em
2 solução salina e ajustadas em densidade celular equivalente à escala 0,5 de
3 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Em seguida, 50 μ l do pré-inóculo foram transferidos
4 para frascos Erlenmeyer (capacidade para 125 mL) contendo 50 mL de caldo ISP2 ou
5 caldo MAK (meio de cultivo proposto por Arumugam e Kumar, 2017). O meio inoculado
6 foi incubado a 35°C por 24h a 150 rpm (Incubadora orbital, Thoth 6430B) para
7 obtenção dos inóculos.

8

9 *Produção dos metabólitos antibacterianos por fermentação líquida submersa*

10 Para a produção dos bioativos em incubadora com agitação orbital
11 (Thoth 6430B), alíquotas de 4 mL dos inóculos foram transferidas para frascos
12 Erlenmeyer (capacidade para 1000 mL) contendo 400 mL dos dois diferentes meios
13 de cultivo, sendo: ISP2 (g/L: extrato de levedura 4.00, extrato de malte 10.00, dextrose
14 4.00, pH 7,0); MAK, (g/L: glicerol 15.00, extrato de levedura 15.00, CaCo₃ 1.50; glicose
15 10.00, NaCl 1.00, pH 7).

16 Todos os frascos foram incubados a 35 °C por 168 h (7 dias) a 200
17 rpm. Alíquotas foram retiradas da produção a cada 24 horas e avaliadas quanto a
18 atividade antibacteriana do sobrenadante livre de células (SLC) pelo método de poço
19 difusão.

20 Para obtenção SLC, os fermentados foram centrifugados a 4°C por 15
21 min a 8860 \times g e esterilizados em filtro com membrana de poliétersulfona (PES) de
22 0.22 μ m (Sarstedt, Alemanha).

23

24 *Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de poço difusão*

25 Inicialmente foi preparado os inóculos de cada bactéria. Para tanto,
26 de 3 a 5 colônias de *A. baumannii*, *S. aureus* e *E. coli*, separadamente, foram
27 suspensas em solução salina e ajustadas em densidade celular equivalente ao tubo
28 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, 200 μ L de cada inóculo foram
29 transferidos para 40 mL de meio MH (Mueller Hinton) (Difco) contendo 1,5% de ágar
30 bacteriológico fundido (mantido a 45°C), homogeneizados e vertidos em placas de
31 Petri de 90 mm de diâmetro. Após solidificados, poços de 7 mm de diâmetros
32 equidistantes foram realizados e, 200 μ L das amostras de SLC foram adicionados aos
33 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após o tempo de incubação, foi
34 medida a zona de inibição em milímetros com auxílio de um paquímetro.

1
2
3
4
5
6
7
8

Ensaio de estabilidade

Termoestabilidade

O SLC foi submetido a diferentes temperaturas e em seguida submetido ao teste de atividade antibacteriana pelo método de poço difusão como descrito anteriormente. Como controle negativo foi utilizado SLC mantido em geladeira (aproximadamente 4°C) (Liu et al., 2007).

Tabela 1: Parâmetros para avaliação da termoestabilidade do SLC

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Instrumento
121	15	Autoclave
100	30	Vapor de autoclave
70	30	Banho maria + termostato digital

9 SLC: Sobrenadante livre de células e esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm.

10

Fotoestabilidade

12 O SLC foi submetido a diferentes comprimentos de onda de luz (Tabela 2) em seguida submetido ao teste de atividade antibacteriana pelo método de poço difusão como descrito anteriormente. Como controle negativo foi utilizado SLC mantido em geladeira ao abrigo da luz (Liu et al., 2007).

16

Tabela 2: Parâmetros para avaliação da fotoestabilidade SLC

Comprimento de onda (nm)	Distância (centímetros)	Tempo (minutos)
254	16	30
365	16	30
700	16	30

17 SLC: Sobrenadante livre de células e esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm.

18

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção e avaliação fenotípica

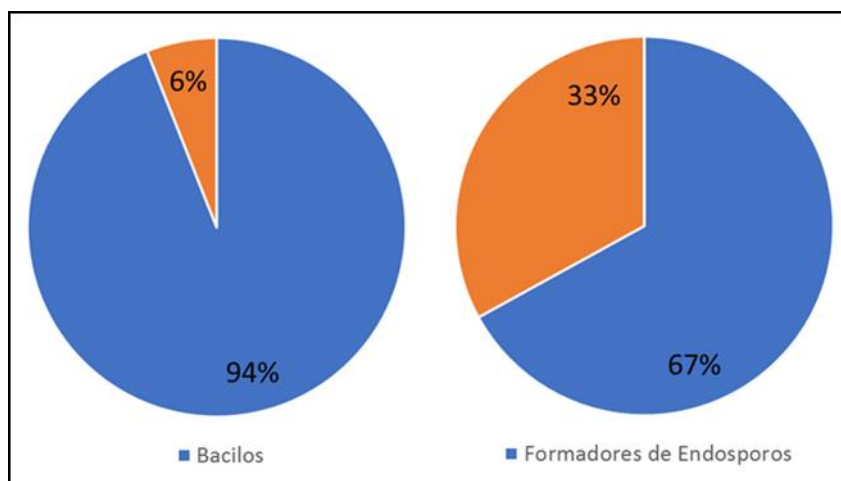
21 A busca por moléculas antimicrobianas envolve, por vezes, a
22 bioprospecção, que trata de investigar a biodiversidade de determinado local.
23 Ecossistemas como floresta secundária semidecídua (Bioma Mata Atlântica),
24 apresentam altas concentrações energéticas e produzem uma grande quantidade de

1 biomassa devido à abundância e diversidade de nutrientes o que os torna excelente
2 ambientes para comunidades microbianas diversas (JANKOSCKI, 2018). A
3 prospecção de microrganismos presentes nesses ecossistemas, vai além de sua
4 identificação, uma vez que muitos desses exemplares são potenciais produtores de
5 compostos envolvidos em diferentes processos bioativos (LI, et al., 2017).

6 Neste sentido, a fim de encontrar uma bactéria com potencial
7 biotecnológico para produzir um ou mais compostos com atividade antibacteriana, foi
8 prospectado, entre 33 isolados bacterianos provenientes de um fragmento de Mata
9 Atlântica e pertencentes ao acervo da biblioteca do Laboratório de Biotecnologia
10 Microbiana (LABIM), o potencial antagonista contra bactérias patogênicas Gram-
11 positiva e Gram-negativas.

12 Inicialmente foram avaliadas características relacionadas ao tipo de
13 parede celular e capacidade de formação de endósporos. Entre os 33 isolados, notou-
14 se que 100% das bactérias prospectadas eram Gram-positivas, cerca de 67% (22
15 isolados) apresentavam a capacidade de produzir endósporos e cerca de 94% (31
16 isolados) apresentavam-se na forma de bacilos (Gráfico 1).

17



18

19

20 **Figura 1.** Resultado da Prospecção de Bactérias pertencentes a Biblioteca LABIM

21

22 Bactérias aeróbias, Gram-positivas, forma bacilar e formadoras de
23 endósporos são amplamente estudadas pela sua alta habilidade adaptativa, sendo
24 encontradas em diversos habitats (LOGAN et al., 2009; DE-VOS, 2009; BENDIA et
25 al., 2018). Devido a essa adaptação, espécies pertencentes a este grupo, com
26 destaque aos gêneros *Bacillus* e *Brevibacillus*, possuem diversas aplicações

1 farmacêuticas e industriais (MONDOL et al, 2013). E ainda, devido às suas taxas de
2 crescimento rápido, produção de ciclos curtos de fermentação, além da sua
3 expressiva capacidade de secretar quantidade significativas de peptídeos para o meio
4 extracelular, são consideradas ótimas para escalonamento industrial (SEWALT, et al.,
5 2016).

6 Jankoski (2021) também analisou o potencial antimicrobiano de
7 isolados bacterianos presentes em solo úmido e 91% de seus isolados apresentaram
8 atividade proteolítica, porém somente um isolado apresentou atividade antagonista
9 contra o marcador escolhido (*Cellulomas fimi*). Por outro lado, Barbosa, et. al (2017)
10 descreveu 68% dos seus isolados de bactérias do gênero *Bacillus* apresentando
11 atividade antagonista contra patógenos de humanos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*
12 *aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*).

13 Com base nos resultados obtidos, 22 isolados são formadores de
14 endósporos, morfologia de bacillus e Gram-positivos (Tabela 3). Por apresentarem
15 características que aproximam das características dos gêneros *Bacillus* e
16 *Brevibacillus*, optou-se por dar seguimento para análises de antagonismos com os 22
17 isolados.

18

19 *Antagonismo direto por cultura dupla*

20 Dentre os 22 isolados submetidos ao teste de antagonismo direto
21 contra os marcadores *A. baumannii*, *S. aureus* e *E. coli*, sete não apresentaram
22 atividade antagônica, quinze apresentaram atividade antagônica moderada e/ou alta
23 a pelo menos um dos patógenos marcadores.

24 Considerando a distribuição das atividades antagonistas, dois
25 isolados apresentaram efeito contra *A. baumannii*, treze contra *S. aureus* e seis
26 isolados contra *E. coli* (Tabela 3) com zonas de inibição maior ou igual a 11 mm.
27 Dentre os 22 isolados, apenas LABIM 17 foi capaz de inibir todos os três indicadores
28 com zona de inibição maior ou igual a 11 mm (Tabela 3). Com estes resultados o
29 isolado LABIM17 foi escolhido para dar prosseguimento nos estudos de identificação,
30 produção de metabólitos extracelulares com atividade antibacteriana e estudo de
31 estabilidade.

32 Desde a década de 70, tem havido uma desaceleração na descoberta
33 de novas moléculas de origem natural com ação antibacteriana (DEMAIN, 2009) em
34 contrapartida o surgimento de microrganismos resistentes a ação antimicrobiana vem

1 aumentando acentuadamente na última década (MOLONEY, 2016),
 2 conseqüentemente se faz necessária a busca de novos agentes produtores de
 3 antibacterianos de amplo espectro para desenvolvimentos de novos antibióticos.

4

Tabela 3. Atividade antagonista de 22 isolados bacterianos Gram-positivos, morfologia de bacilos e formadoras de endósporos

Isolados antagonistas	Zonas de inibição em milímetro (mm)		
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (OXA-23- positivo)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
LABIM 16	0	5	13
LABIM 17	11	13	18
LABIM 18	0	0	17
LABIM 20	0	0	12
LABIM 21	0	0	16
LABIM 23	0	0	11
LABIM 24	0	12	18
LABIM 25	0	12	23
LABIM 26	0	11	20
LABIM 29	0	0	25
LABIM 30	15	0	0
LABIM 33	0	0	22
LABIM 34	0	0	24
LABIM 35	0	13	0
LABIM 36	0	0	26

5 LABIM 04, LABIM 05, LABIM 06, LABIM 07, LABIM 27, LABIM 28 e LABIM 32 não
 6 apresentaram atividade antagonista contra *A. baumannii*, *S. aureus* e *E. coli*.

7 Atividade antagônica: inexistente (0 mm), baixa (<10 mm), moderada (11-20 mm) e
 8 alta (>20 mm).

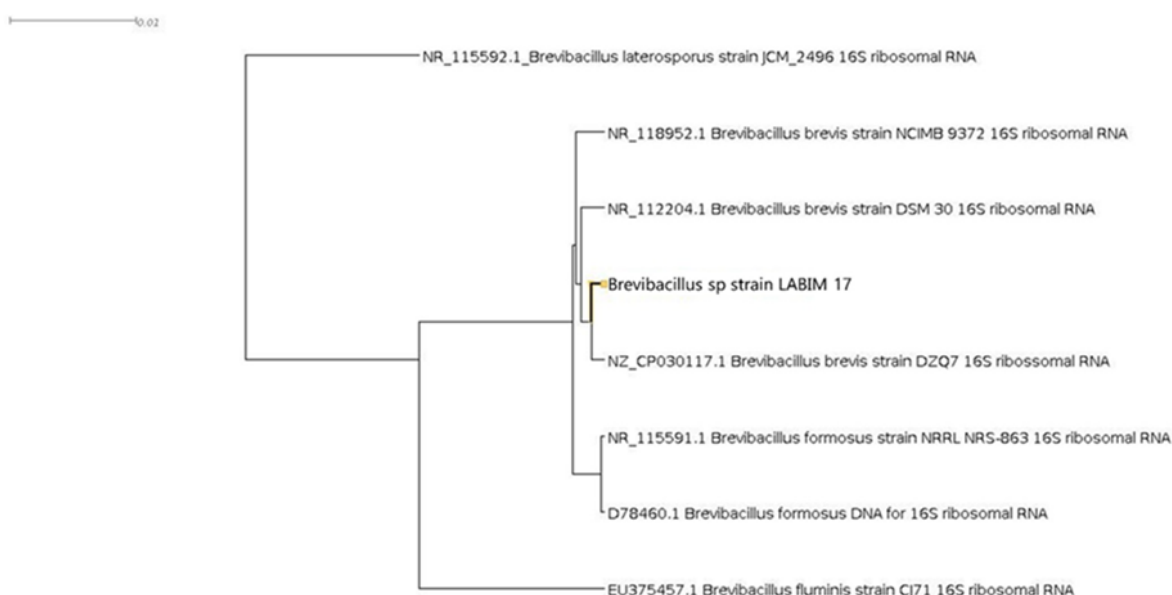
9

10 *Identificação molecular*

11 Com base na sequência do gene 16S, LABIM 17 foi identificada como
 12 *Brevibacillus* sp. e a árvore filogenética esta apresentada na Figura 3. As
 13 classificações em nível de espécie desse grupo com base apenas na análise de rDNA

1 16S têm se mostrado inconsistentes, seus resultados devem ser interpretados com
 2 cautela (JOHNSON & DUNLAP, 2019; RAY, et al., 2020). Neste sentido, classificamos
 3 LABIM 17 apenas em nível de gênero. Análises futuras com dados de
 4 sequenciamento do genoma completo (WGS) da cepa *Brevibacillus* sp. LABIM17
 5 serão necessários para classificar a nível da espécie com mais confiança e ainda,
 6 oferecer uma plataforma para a análise de agrupamentos gênicos envolvidos na
 7 biossíntese de metabólitos secundários antibacterianos.

8 O gênero *Brevibacillus* foi descrito pela primeira vez em 1900, porém,
 9 até a década de 90 era classificado como uma espécie do gênero *Bacillus*. Sua
 10 reclassificação para *Brevibacillus* aconteceu no ano de 1996 (SHIDA *et al.*, 1996).



12
 13 **Figura 2.** Árvore filogenética reconstruída a partir da análise do gene do RNA
 14 ribossômico 16S do isolado LABIM 17.

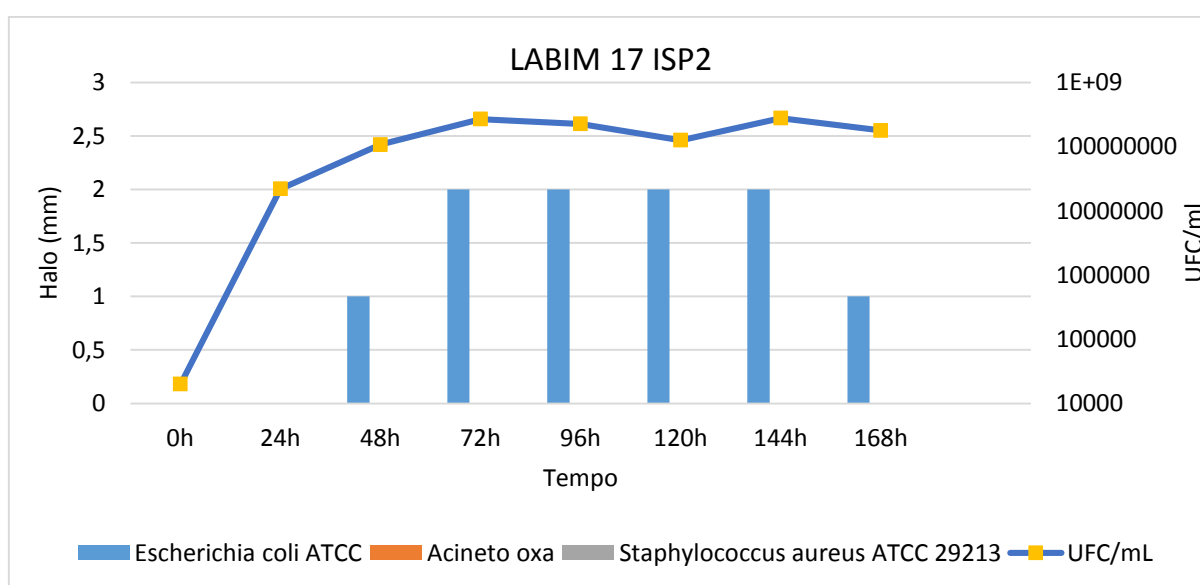
15
 16 Os indivíduos pertencentes ao gênero *Brevibacillus* são notoriamente
 17 conhecidos pela sua vasta capacidade metabólica e pela produção de metabólitos
 18 com uma diversidade estrutural e potencial antimicrobianos (SONG *et al.*, 2012). O
 19 que vai de encontro aos esforços deste trabalho em encontrar uma bactéria que
 20 produza moléculas com poder antibacteriano de amplo espectro.

21
 22 *Produção em incubadora com agitação orbital*

1 *Brevibacillus* spp. são bastonetes Gram-positivos ou Gram variáveis
 2 pertencentes ao filo Firmicutes, são formadores de endósporos e, geralmente,
 3 aeróbios estritos (LOGAN & DE VOS, 2009; YANG & YOUSEF, 2018). Sua
 4 temperatura e pH ideais para cultivo são, respectivamente, 35 °C e 7,0. (LOGAN &
 5 DE- VOS, 2009).

6 Sob a luz das informações trazidas pela identificação molecular, as
 7 condições de produção foram determinadas de acordo com as características
 8 apresentadas pelos indivíduos pertencentes ao gênero *Brevibacillus*. A produção de
 9 metabolitos antibacterianos foi realizada por fermentação líquida submersa utilizando
 10 dois diferentes meios de cultura diferindo entre si quanto a fonte de carbono, teor
 11 proteico e concentração de sal. A cada 24 horas, foram coletadas alíquotas do
 12 fermentado e avaliado a atividade antibacteriana do SLC por meio do teste de poço
 13 difusão (Gráfico 3 e Gráfico 4).

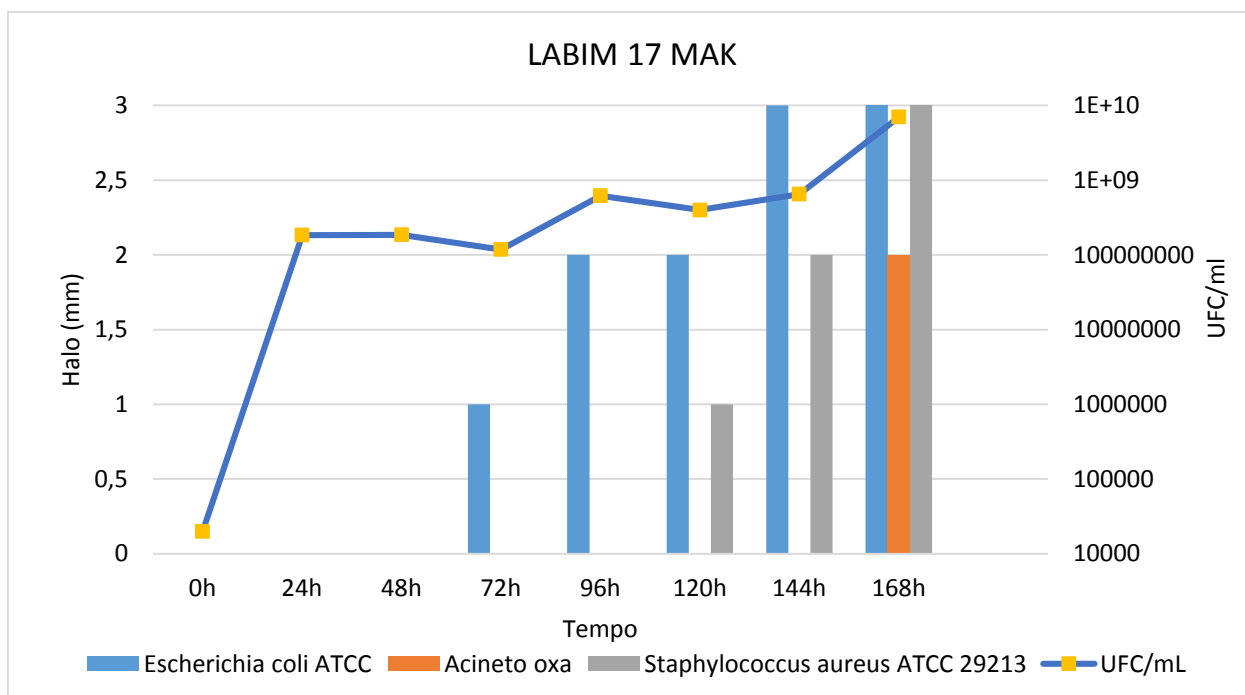
14



15

16 **Figura 3.** Atividade antibacteriana do Sobrenadante Livre de Células de *Brevibacillus*.
 17 *brevis* LABIM 17 contra *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e
 18 *Escherichia coli* por fermentação líquida submersa em meio ISP2.

19



1

2 **Figura 4.** Atividade antibacteriana do Sobrenadante Livre de Células de *Brevibacillus*.
 3 *brevis* LABIM 17 contra *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e
 4 *Escherichia coli* por fermentação líquida submersa em meio MAK.

5

6 Para uma efetiva produção de moléculas com ação antimicrobiana,
 7 faz-se necessário selecionar meios de cultura que potencializam a produção dos
 8 compostos de interesse (MILAGRE, 2017; RUIZ-RUIZ *et al.*, 2012). Diante de tal
 9 afirmação, notou-se que o meio MAK foi mais eficiente como base para produção de
 10 moléculas com potencial ação antagonista contra os marcadores utilizados no
 11 presente estudo.

12 Nota-se a presença de metabólitos com atividade antagonista já nas
 13 72 h de produção no meio MAK. Ao longo do processo de fermentação nota-se a
 14 intensificação da atividade antibacteriana de amplo espectro.

15 Como a inibição dos diferentes marcadores acontece em diferentes
 16 tempos, pode-se supor que se trata de diferentes moléculas.

17 O estudo de Arumugam, et al (2017) mostrou que ao se utilizar meio
 18 de cultura base composto por extrato de levedura, cloreto de sódio e glicose
 19 acrescidos de glicerol e carbonato de cálcio em concentrações específicas e em pH
 20 7.0 teve um efeito significativo na produção de antimicrobianos em 1,5 vezes.

21 Em um outro trabalho, Arumugam, et al (2016) obteve sucesso ao
 22 demonstrar a atividade antagonista da cepa *Brevibacillus brevis* EGS9 contra

1 patógenos isolados a partir de amostras de urina de pacientes de UTI. Estes
 2 resultados demonstram um grande potencial de produção de metabólitos com
 3 atividade antagonista.

4

5 *Ensaio de estabilidade*

6 Com a determinação das melhores condições de cultivo para que a
 7 cepa LABIM 17 produzisse compostos com potencial ação antagonista, o SLC foi
 8 submetido a ensaios de estabilidade afim de se investigar características químicas
 9 da(s) molécula(s) produzidas. O SLC foi resistente aos diferentes comprimentos de
 10 onda de luz visível e UV, porém perde sua atividade em temperaturas superiores a
 11 70°C (Tabela 4). Mosela (2020) também notou que a(s) molécula(s) bioativas contra
 12 *Candida* spp. perdiam atividade em temperaturas superiores a 70°C.

13 Curiosamente, a radiação UV-A parece afetar sua atividade contra *A.*
 14 *baumannii*, *S. aureus* mais do que a atividade contra *E. coli*. No geral, esses resultados
 15 indicam que *B. brevis* LABIM 17 pode produzir mais do que apenas uma molécula
 16 com ação antibacteriana que são moderadamente estáveis a luz e susceptíveis a
 17 temperaturas elevadas.

18

Tabela 4: Ensaios de foto e termoestabilidade

Tratamentos	Zonas de inibição em milímetro (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>
121°C/15min	0	0	0
100°C/30min	0	0	0
70°C/30min	7	2	1,4
4°C/30min	6,5	3	2,8
Controle	6,7	3,1	3,1
Luz visível	5,4	6	2
254nm (UV-B)	6	3	7
365nm (UV-A)	7	2,2	3,65
Controle	6,7	3,1	3,1

19

20 Uma das características do gênero *Brevibacillus* é a sua capacidade
 21 de produzir enzimas extracelulares antimicrobianas (BAINDARA *et al.*, 2016). O fato
 22 da(s) molécula(s) estudadas no presente artigo se apresentarem susceptíveis a altas

1 temperaturas, pode ser um indicativo de sua natureza peptídica.

2

3

4 **CONCLUSÃO**

5 A seleção de bactéria foi bem-sucedida, pois a cepa *B. brevis* LABIM
6 17 produziu metabólitos que apresentaram atividade contra patógenos de humanos
7 quando produzidos em meio líquido, porém mais estudos são necessários para
8 purificação e caracterização do(s) composto(s).

9

10

11 **REFERÊNCIAS**

12 ARUMUGAM, T. SENTHIL, K. P. Optimization of media components for production of
13 antimicrobial compound by *Brevibacillus brevis* EGS9 isolated from mangrove
14 ecosystem. *Journal of Microbiological Methods*. v. 142. p 83 -89. set. 2017.

15

16 ARUMUGAM, et al. HPTLC fingerprint profile, in vitro, antioxidant and evaluation os
17 antimicrobial compound produced from *Brevibacillus brevis* EGS9 against multidrug
18 resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*. 2016

19

20 BAINDARA, et al. Laterosporulin10: a novel defensin like class IId bacteriocin from
21 *Brevibacillus* sp. strain SKDU10 with inhibitory activity against microbial
22 pathogens. **Microbiology**, v. 162, n. 8, p. 1286-1299, 2016.

23

24 BARAKA, et al. Health care providers' perceptions regarding antimicrobial
25 stewardship programs (AMS) implementation-facilitators and challenges: a cross-
26 sectional study in the Eastern province of Saudi Arabia. *Annals of Clinical
27 Microbiology and Antimicrobials*. v 24. set. 2019.

28

29 BARBOSA, et al. Potencial antagonista de bacterias do gênero *Bacillus* isoladas de
30 ninhos de *Trigona spinipes* sobre bacterias patogênicas. *Anais da Reunião Regional
31 da SBPC no Cariri (CE)*. mai. 2017.

32

33 BOUCKAERT, et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary
34 Analysis. *PLoS Computational Biology*, v. 10. e1003537. abril. 2014

- 1
2 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Approved
3 Guideline. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2015.
- 4 DE-VOS, P. Genus IV. *Brevibacillus Shida*, Takagi, Kadowaki and Komagata 1996a,
5 942VP. In: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. (ed.). Bergey's manual of
6 systematic bacteriology (2^a ed.). New York: Springer, 2009. p. 305–316.
- 7
- 8 DEMAIN A.L. Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. **Medicinal**
9 **Research Reviews**, v.29, p.821-842, 2009.
- 10
- 11 EWING, et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy
12 assessment. Genome Research. v. 8. p. 175–185. 1998
- 13
- 14 HUSON, D. H., BRYANT, D. Estimating phylogenetic trees and networks using
15 SplitsTree 4. Manuscript in Preparation, Software Available from Www. Splitstree.
16 Org. 2005
- 17
- 18 JANKOSKI, P. R. Prospecção de isolados bacterianos de áreas úmidas quanto à
19 produção de novas moléculas com atividade antimicrobiana. 60 f. Dissertação
20 (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas
21 da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- 22
- 23 JANKOSKI, P. R., CORREA, A. N., BRANDELLI, A., MOTTA, A. S. Biological activity
24 of bacteria isolated from wetland sediments collected from a conservation unit in the
25 southern region of Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciência. vol 93. p 3-18.
26 2021.
- 27
- 28 JOHNSON, E. T., DUNLAP, C. A. Phylogenomic analysis of the *Brevibacillus brevis*
29 clade: a proposal for three new *Brevibacillus species*, *Brevibacillus fortis* sp. nov.,
30 *Brevibacillus porteri* sp. nov. and *Brevibacillus schisleri* sp. nov. Antonie van
31 Leeuwenhoek, v 112. p. 991–999. jan, 2019.
- 32
- 33 LI Y, et al. Diversity of cultivable protease-producing bacteria in Laizhou Bay
34 sediments, Bohai Sea, China. Frontiers in Microbiology. v8. p 405. 2017

- 1 LIU, C. H. et al. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in
2 vitro and identification of its antifungal components. Applied Microbiology and
3 Biotechnology 76, 459–466 (2007).
4
- 5 LOGAN, et al. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic,
6 endospore-forming bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary
7 Microbiology, [S.L.], v. 59, n. 8, p. 2114-2121, 2009
8
- 9 Maddison, W. P., Maddison, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary
10 analysis. 2011. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>> Acesso em maio de
11 2018.
12
- 13 MILAGRE, L. P. Caracterização de metabólitos secundários produzidos por isolados
14 do gênero *Streptomyces* com atividade contra fungos fitopatogênicos. 2017. 55 f.
15 Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de
16 Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
17 Alegre, 2017.
18
- 19 MILLER, et al. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large
20 phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010.
21
- 22 MOLONEY, M. G. Natural products as a source for novel antibiotics. **Trends 13 in**
23 **pharmacological sciences**, v. 37, n. 8, p. 689-701, 2016.
24
- 25 MONDOL, et al. Diversity of Secondary Metabolites from Marine Bacillus Species:
26 Chemistry and Biological Activity. Marine Drugs. v 11. p 2846 – 2872. ago. 2013.
27
- 28 MOSELA, M. Compound producer *Brevibacillus brevis*: evaluation of
29 physicochemical characteristics and anti-*Candida* activity. 2020. 51f. Dissertation
30 (Master's Degreee in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.
31
- 32 MOURA, et al. Avaliação antimicrobiana das bactérias, isolada do solo do igarapé do
33 quarenta de Manaus-AM. Brazilian Journal Of Development, Curitiba, v. 7, n. 5, p.
34 50002-50012, 2021.

- 1
2 NYLANDER, J. (2008). MrModeltest2 v. 2.3 (Program for selecting DNA substitution
3 models using PAUP*). Evolutionary Biology Centre, Uppsala, Sweden.
4
- 5 De OLIVEIRA, et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds
6 produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306
7 strain. *Bio. Control*. v.56, p.125 – 31. out, 2010.
8
- 9 De OLIVEIRA, et al. Tópicos Especiais em Microbiologia. Londrina: livro eletrônico,
10 2015. p 180 – 199.
11
- 12 De OLIVEIRA, et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas*
13 *aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front. Microbiol.* v.7,
14 p.1 - 12. fev. 2016.
15
- 16 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Antimicrobial resistance. World
17 Health Organization, 2020. Disponível em: < [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)
18 [sheets/detail/antimicrobial-resistance](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)>. Acesso em: 21, set. 2021.
19
- 20 RAMBAUT, et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer
21 1.7. *Systematic Biology*. p. 901 – 904. mai. 2018.
22
- 23 RAY, et al. Chapter 9 - *Brevibacillus*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Livro*
24 *eletrônico*. 2020. p. 149–167. Academic Press Book
25
- 26 RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous
27 two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends. *Journal of*
28 *Chromatography A*, [S.L.], v. 1244, p. 1-13, 2012.
29
- 30 SEWALT, et al. The Generally Recognized as Safe (GRAS) process for industrial
31 microbial enzymes. *Industrial Biotechnology*. v12. p 295–302, out. 2016
32
- 33 SHIDA, et. al. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and
34 *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, [S.L.], v.

- 1 46, n. 4, p. 939-946, 1996.
2
- 3 SINHA, M. S.; KESSELHEIM, A. S. Regulatory incentives for antibiotic drug
4 development: a review of recent proposals. *Bioorganic Med Chemistry*. v 24. p 6446-
5 6451. Dez. 2016
6
- 7 SONG, et al. Tostadin, a novel antibacterial peptide from an antagonistic
8 microorganism *Brevibacillus brevis* XDH. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 111, p.
9 504-506, 2012.
10
- 11 WEISBURG, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal*
12 *of Bacteriology*. v. 173. p: 697–703.jan. 1991.
13
- 14 YANG, X.; YOUSEF, A. E. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.:
15 structure, classification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and*
16 *Biotechnology*, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 34-57, 2018.
17
18

1 Manuscript Submit to Microbiology Resource Announcements - American Society for
2 Microbiology Journals - <https://journals.asm.org/journal/mra>

3

4 **6. ARTIGO 2: Draft genome sequence of *Brevibacillus brevis* LABIM17, a**
5 **biotechnologically important antimicrobial-producing bacteria**

6

7 Larissa de Medeiros Chagas^a; Gustavo Manoel Teixeira^a; João Paulo de Oliveira^a;
8 Maria Luiza Abreu Nicoletto^a; Rosiana Bertê^a; Daniel Vieira da Silva^a; Danilo Sipoli
9 Sanches^b; Jacques Duílio Brancher^c; Ulisses Pereira Padua^d and Admilton Gonçalves
10 de Oliveira^{a, e, *}

11

12 ^aDepartment of Microbiology, State University of Londrina (UEL), C.P. 10.011, 86057-
13 970, Londrina-PR, Brazil

14 ^bFederal University of Technology - Paraná, 86300000, Cornélio Procópio, PR, Brazil

15 ^cDepartment of Computer Science, State University of Londrina (UEL), 86057-970,
16 Londrina, PR, Brazil

17 ^dDepartment of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina (UEL),
18 C.P. 10.011, 86.057-970, Londrina-PR, Brazil

19 ^eLaboratory of Electron Microscopy and Microanalysis, State University of Londrina
20 (UEL), C.P. 10.011, 86.057-970, Londrina-PR, Brazil

21 *Corresponding author: E-mail*admilton@uel.br

22

23 **Running title:** Draft Genome of *Brevibacillus brevis* LABIM17

24

25 **Keywords:** Functional genes; Antimicrobial activity; Secondary metabolites.

26

27 **Abstract**

28 ***Brevibacillus brevis* LABIM17 is a bacterial isolate with potential for application**
29 **in several areas. Its draft genome sequence contains a chromosome of 5,950,202**
30 **bp with 5,477 coding sequences and exhibits 12 clusters involved in the**
31 **production of secondary metabolites, which are likely responsible for the**
32 **antimicrobial activity of LABIM17 against several human and plant pathogens.**

33

34

1 Many microorganisms produce secondary metabolites which comprise
2 a source for the development of biological products for plant disease control or new
3 antibiotics for human disease control and/or other industrial applications. Throughout
4 history, bioprospecting for biological agents has focused on traditional methods based
5 on isolation and 'blind'-culture optimization. However, advances in next-generation
6 sequencing technologies have offered a platform for the pan-genomic analysis of
7 microorganisms down to the gene level (Maghembe et al., 2020). This strategy, in
8 addition to classical methods, can accelerate the development of microbiological
9 technologies. In anticipation of future in-depth genomic analyses and their potential
10 applications, here we present genomic data on *Brevibacillus brevis* LABIM17, an
11 antagonist of human and plant pathogens (Chagas et al., 2020; Ferreira, 2020),
12 isolated in nutrient agar at 28°C for 48h from the soil of a semideciduous secondary
13 forest fragment in Londrina-PR, Brazil (23°19'37.8"S 51°12'22.4"W).

14 The Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research) was used for genomic
15 DNA extraction, and the library was assembled using the Nextera XT DNA library
16 preparation kit. LABIM17 was sequenced using the MiSeq platform (BPI -
17 Biotechnology Research and Innovation, Brazil) with the Miseq Reagent V2 Micro (300
18 cycles, Illumina). The total number of paired-end reads from the sequencing process
19 was 3,111,712, and the size of the fragments varied from 35 to 151 bp. Reads were
20 subjected to quality analysis with FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). Phred quality
21 scores less than 30 and with one or more ambiguities were removed, and the used
22 trimming parameters were defined and implemented according to the Trimmomatic
23 v0.39 tool (Bolger, Lohse, and Usadel, 2014). The reads were filtered to generate
24 contigs using *de novo* assembly methods with IDBA v1.1.3 (Peng et al., 2010).
25 Assemblies with different k-mer sizes were compared using QUAST v5.0.2 (Gurevich
26 et al., 2013), and the best one (with 362 contigs and an N50 value of 54,841 bp) was
27 selected for scaffolding. The average sequencing coverage was estimated at 78-fold.
28 The scaffolding phase was carried out using the CONTIGuator script, v2.7 (Galardini
29 et al., 2011), with *B. brevis* NBRC 100599 as a reference genome. The annotation was
30 created using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). The
31 genome was estimated at 5,950,202 bp, with G+C content of 47.5%, 5,477 coding
32 sequences, and the average nucleotide identity (Lee et al., 2016) with its closest strain
33 *Brevibacillus brevis* ATCC 35690T was 97.79%. We propose that the *Brevibacillus*
34 *brevis* LABIM17 strain should follow the proposed classification for ATCC Strain

1 35690T in the future, given a recent study suggesting that *B. brevis* ATCC 35690T be
2 reclassified as *Brevibacillus schisleri* sp. nov. ATCC 35690T (Johnson and Dunlap,
3 2019). Twelve putative gene clusters responsible for secondary metabolite
4 biosynthesis were identified using the antiSMASH 6.0 tool (Blin et al., 2021), seven of
5 which were related to known clusters from the MIBiG database (Medema et al., 2015).
6 It was possible to highlight clusters linked to the synthesis of Petrobactin, Octapeptin,
7 Tyrocidine, Gramicidin, Zwittermicin, Aurantinin, and Pacidamycin.

8

9 **Accession number(s).** The whole genome project is deposited in the GenBank.
10 Sequence Read Archive and BioProject (PRJNA780906), BioSample
11 (SAMN23203606), Accession No. (CP087980).

12

13 **Conflicts of interest**

14 The authors declare no conflicts of interest.

15

16 **Acknowledgments**

17 We acknowledge the financial support provided by the National Council for Scientific
18 and Technological Development (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e*
19 *Tecnológico*) – CNPq (Grant No. 315844/2018-3) and the Araucaria Foundation for
20 Scientific and Technological Development of the State of Paraná (*Fundação Araucária*
21 *de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná*) -
22 FAPPR.

23

24 **References**

25 Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence
26 Data [Online]. Available from:
27 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

28

29 Aziz, R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., et
30 al. The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC*
31 *Genomics* (2008) 9 (February): 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.

32

33 Blin, K., Shaw S., Kloosterman A.M., Charlop-Powers Z., van Wezel G.P., Medema
34 M.H., Weber T. antiSMASH 6.0: Improving Cluster Detection and Comparison

- 1 Capabilities. *Nucleic Acids Research* (2021) 49 (W1): W29–35.
2 <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>.
3
- 4 Bolger, A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina
5 Sequence Data. *Bioinformatics* (2014) 30 (15): 2114–20.
6 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
7
- 8 Chagas L.M., Teixeira G.M, Mosela M., Jesus M.L.A., Thihara I.R.T., Baptista J.P.,
9 Sanches P.P.S., Montanari G.C.C., Lioni L.M.Y., De Oliveira A.G. (2020).
10 Antimicrobial Activity Of Metabolites Produced By *Brevibacillus* sp. Labim 17 Under
11 Different Culture Conditions. Work presented at: Anais do III Congresso Paranaense
12 de Microbiologia.
13
- 14 Ferreira I.C., Bertê R., De Oliveira A.G. (2020). Avaliação in vitro e in vivo do controle
15 de *Xanthomona Vasicola* Pv. Vasculorum por *Brevibacillus Brevis*. Work presented
16 at: 10º EAITI – Encontro Anual de Iniciação Tecnológica.
17
- 18 Galardini, M., Biondi E.G., Bazzicalupo M., Mengoni A. CONTIGuator: A Bacterial
19 Genomes Finishing Tool for Structural Insights on Draft Genomes. *Source Code for*
20 *Biology and Medicine* (2011) 6 (June): 11. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-6-11>.
21
- 22 Gurevich, A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: Quality Assessment Tool for
23 Genome Assemblies. *Bioinformatics* (2013) 29 (8): 1072–75.
24 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
25
- 26 Johnson, E.T., Dunlap C.A.. Phylogenomic Analysis of the *Brevibacillus Brevis*
27 Clade: A Proposal for Three New *Brevibacillus* Species, *Brevibacillus Fortis* Sp. Nov.,
28 *Brevibacillus Porteri* Sp. Nov. and *Brevibacillus Schisleri* Sp. Nov. *Antonie van*
29 *Leeuwenhoek* (2019) 112 (7): 991–99. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01232-4>.
30
- 31 Lee, I., Kim Y.O., Park S., Chun J. OrthoANI: An Improved Algorithm and Software
32 for Calculating Average Nucleotide Identity. *International Journal of Systematic and*
33 *Evolutionary Microbiology* (2016) 66 (2): 1100–1103.
34 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>.

- 1
2 Medema, M.H., Kottmann R., Yilmaz P., Cummings M., Biggins J.B., Blin K., de
3 Bruijn I., et al. Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster. *Nature*
4 *Chemical Biology* (2015) 11 (9): 625–31. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>.
5
6 Peng, Y., Leung H.C.M., Yiu S.M., Chin F.Y.L. IDBA – A Practical Iterative de Bruijn
7 Graph De Novo Assembler. *Lecture Notes in Computer Science* (2010) 6044 LNBI:
8 426–40. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12683-3_28.
9
10 Maghembe R., Damian D., Makaranga A., Nyandoro S.S., Lyantagaye S.L., Kusari
11 S., Hatti-Kaul R. 2020. Omics for Bioprospecting and Drug Discovery from Bacteria
12 and Microalgae. *Antibiotics* (Basel).9(5): 229. <https://doi:10.3390/antibiotics9050229>.
13

1 7. CONCLUSÃO

2 Bactérias são valiosas ferramentas na busca de novos compostos
3 bioativos, especialmente aqueles com atividade antimicrobiana. Neste sentido, a
4 prospecção de uma bactéria produtora de compostos com potencial antibacteriano,
5 foi bem-sucedida, pois a cepa *B. brevis* LABIM 17 produziu metabólitos que
6 apresentaram atividade contra patógenos de humanos quando produzidos em meio
7 líquido. Em análises preliminares de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese
8 de metabólitos secundários antibacterianos foram identificados agrupamentos para
9 produção de Petrobactina, Octapeptina, Tirocidina, Gramicidina, Zwittermicin e
10 Aurantinina. Todos estes resultados sugerem que *B. brevis* LABIM 17 tem um bom
11 potencial para uso como agente produtor de antibacterianos, porém mais estudos são
12 necessários para purificação, caracterização e aumento da produtividade do(s)
13 composto(s) antibacteriano(s) a fim de torná-lo(s) uma apresentação comercial.