



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LAYANNE STHEFANY DE ANDRADE ARAÚJO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO SEMIÁRIDO  
PARAIBANO: AVALIANDO SEU POTENCIAL PROBIÓTICO**

**JOÃO PESSOA – PB  
2017**

**LAYANNE STHEFANY DE ANDRADE ARAÚJO**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO SEMIÁRIDO  
PARAIBANO: AVALIANDO SEU POTENCIAL PROBIÓTICO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Brígida Thaís Luckwu de Lucena.

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Estefânia Fernandes Garcia

**JOÃO PESSOA - PB  
2017**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A663i Araujo, Layanne Sthefany de Andrade.  
Identificação de bactérias isoladas do solo semiárido paraibano [manuscrito] : *avaliando seu potencial probiótico* / Layanne Sthefany de Andrade Araujo. - 2017.  
50 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2017.

"Orientação : Profa. Dra. Brígida Thais Luckwu de Lucena, Departamento de Biologia - CCBS."

"Coorientação: Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia, UFPB - Universidade Federal da Paraíba"

1. Identificação. 2. RNAr 16 S. 3. *Bacillus ginsengihumi*. 4. Potencial probiótico.

21. ed. CDD 579.3

LAYANNE STHEFANY DE ANDRADE ARAÚJO

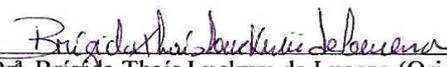
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO SEMIÁRIDO PARAIBANO:  
AVALIANDO SEU POTENCIAL PROBIÓTICO

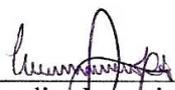
Trabalho de Conclusão de Curso  
Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Estadual da Paraíba, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

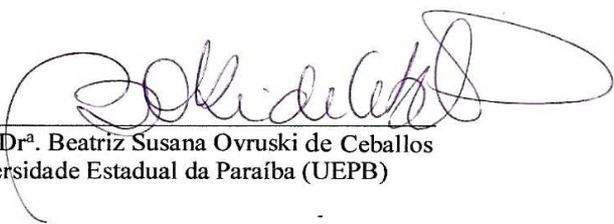
Área de concentração: Ciências  
Biológicas.

Aprovada em: 07/12/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Brígida Thaís Luckwu de Lucena (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof.<sup>a</sup> Ms. Caroline Junqueira Barcellos Leite  
Unifacisa

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beatriz Susana Ovruski de Ceballos  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por me proporcionar sabedoria e persistência para alcançar meus objetivos, apesar dos obstáculos. E obtendo por fruto deste empenho, este trabalho.

À minha família, que sempre contribuiu em minha formação e incentivou-me a ter uma boa educação, a qual permitiria uma vida plena no futuro;

Ao meu noivo, pelo apoio e incentivo para concluir este trabalho.

À minha professora e orientadora Brígida, pela paciência, dedicação e empenho contribuindo para o meu aprendizado, proporcionando as ferramentas e os meios, os quais permitiram concluir mais um ciclo na minha vida acadêmica.

À minha Co-orientadora Estefânia, por dispor de seu tempo para me orientar e ensinar a realizar os testes laboratoriais.

Aos meus amigos dos laboratórios LBM, LEFA e LECOMP que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

As minhas parceiras de laboratório Anna Gabrielly, Raíssa Ferreira e Maria Helena pelo companheirismo, amizade e incentivo em continuar os experimentos.

À Universidade Estadual da Paraíba, por fornecer estrutura para realização deste projeto.

Ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPB, por fornecer sua estrutura e seus equipamentos necessários para alcançar os resultados deste estudo.

Agradeço a todos, que fizeram parte dessa etapa da minha vida.

Obrigada!

“Falar sem aspas, amar sem interrogação, sonhar com reticências, viver sem ponto final”.

Charles Chaplin

## RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial probiótico *in vitro* de amostras bacterianas provenientes do solo semiárido paraibano por meio do isolamento, triagem e identificação, como também de características morfológicas, fisiológicas e moleculares. Inicialmente foram isoladas 80 amostras bacterianas usando meio seletivo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), em seguida, foram submetidas ao método de coloração de Gram e teste da atividade da enzima catalase. Após esta triagem foram pré-selecionados 31 isolados Gram positivos e catalase negativos, os quais seguiram para avaliação do potencial probiótico. Nesta avaliação, os isolados foram submetidos a três diferentes níveis de pH variando do pH neutro 7,2 da saliva ao pH ácido 2,0 do suco gástrico por até 3 horas, com intuito de simular a sua passagem pelo trato gastrointestinal. Resultando assim, na seleção de 10 isolados que apresentaram boa tolerância sob essas condições. Logo, os isolados foram avaliados quanto seu potencial antagonico frente a cinco bactérias patogênicas alimentares: *Salmonella typhi* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* enteropatogênica (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Neste teste dois isolados (MRS 1.7 e MRS 7.16) apresentaram halo de inibição superior a 1 mm contra *Salmonella typhi*. A identificação molecular destes microrganismos transcorreu com a análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S sendo o MRS 1.7 identificado como *Bacillus sp.* e o MRS 7.16 como *Bacillus ginsengihumi*. Contudo, baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se que o *Bacillus ginsengihumi* possui maior potencial para desenvolvimento de novas pesquisas e em aplicações futuras como probiótico.

**Palavras-Chave:** Identificação. RNAr 16S. *Bacillus ginsengihumi*. Potencial probiótico.

## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the potential probiotic in vitro bacterial samples from semi-arid Paraíba, through isolation, screening and identification by means of morphological, physiological and molecular features. Initially, 80 bacterial samples were isolated using selective medium Man, Rogosa and Sharpe (MRS), then were subjected to the Gram stain method and test the activity of the enzyme catalase. After this screening, were pre-selected 31 Gram-positive and catalase negative, which followed for the evaluation of potential probiotic. In this evaluation, the isolates were subjected to four different pH levels ranging from the neutral pH 7,2 of the saliva to acidic gastric juice pH 2,0 for up to 3 hours in order to simulate your passage through the gastrointestinal tract. Thus resulting, in the selection of 10 isolates that showed good tolerance under these conditions. Soon, the isolates were evaluated as potential antagonistic front five foodborne pathogens: *Salmonella typhi* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *enteropathogenic Escherichia coli* (ATCC 8739), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). This test two isolates MRS 1.7 and MRS 7.16 showed inhibition halo exceeding 1 mm against *Salmonella typhi*. The molecular identification of these microorganisms proceeded with the analysis of the sequence of 16S ribosomal RNA gene being the MRS 1.7 identified as *Bacillus sp.* and MRS 7.16 as *Bacillus ginsengihumi*. However, based on the results obtained, we conclude that the *Bacillus ginsengihumi* has greater potential for development of new research and in future applications as probiotic.

**Keywords:** Identification. 16S rRNA. *Bacillus ginsengihumi*. Probiotic Potential.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no estudo.....	14
<b>Figura 2 -</b>	Localização da área de coleta no estado da Paraíba.....	15
<b>Figura 3 -</b>	Desenho experimental do isolamento.....	16
<b>Figura 4 -</b>	Técnica de coloração de Gram.....	17
<b>Figura 5 -</b>	Teste de atividade da enzima catalase.....	18
<b>Figura 6 -</b>	Ilustrações dos métodos utilizados no teste de sensibilidade a pHs.....	19
<b>Figura 7 -</b>	Ilustrações dos métodos utilizados no teste de antagonismo a patógenos.....	22
<b>Figura 8 -</b>	Seleção do tratamento para isolamento bacteriano.....	26
<b>Figura 9 -</b>	Resultado do teste de coloração de Gram.....	27
<b>Figura 10 -</b>	Halos de inibição contra o patógeno <i>Salmonella typhi</i> .....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Resultado do teste de coloração de Gram e morfologias bacterianas.....	27
<b>Tabela 2 -</b>	Respostas das isolados aos testes de coloração de Gram e catalase.....	28
<b>Tabela 3 -</b>	Avaliação de presença (+) e ausência (-) de multiplicação das bactérias quando expostos a pH 2 e pH 3 após 0 e 3 horas.....	29
<b>Tabela 4 -</b>	Atividade antagônica contra patógenos de veiculação alimentar.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Dietetic Association</i>
ANVISA	Agência Nacional de Segurança Sanitária
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BAL	Bactéria Ácido Lática
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLAST N	<i>BLAST</i> Padrão de nucleotídeo
Bsh	Clima semiárido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade óptica
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GDBM	Grupo de Diversidade e Biotecnologia Microbiana
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HCL	Ácido Clorídrico
IBD	Doença inflamatória intestinal
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MRS	Caldo De Man, Rogosa e Sharpe
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS	Tampão salino fosfatado
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tampão de extração Tris-EDTA
TSB	Caldo de Triptona de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1	Microrganismos probióticos: definição e critérios de seleção.....	2
2.2	Benefícios e mecanismos de ação dos probióticos.....	4
2.3	Bactérias e suas aplicações como probióticos.....	6
2.3.1	Bactérias ácido lácticas (BAL) .....	6
2.3.1.1	Uso das bactérias ácido lácticas como probióticos.....	7
2.3.2	Gênero <i>Bacillus</i> .....	8
2.3.2.1	Uso dos <i>Bacillus</i> como probióticos.....	10
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	12
3.1	Objetivo geral.....	13
3.2	Objetivos específicos.....	13
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
4.1	Área de coleta.....	15
4.1.1	Coleta das amostras de solo.....	15
4.2	Isolamento bacteriano.....	15
4.3	Triagem dos isolados bacterianos.....	17
4.3.1	Coloração de Gram.....	17
4.3.2	Teste de atividade da catalase.....	18
4.4	Avaliação do potencial probiótico.....	18
4.4.1	Teste de sensibilidade ao pH.....	18
4.4.2	Antagonismo a patógenos.....	21
4.5	Identificação molecular bacteriana.....	23
4.5.1	Extração do DNA.....	23
4.5.2	Amplificação do gene 16S.....	24
4.5.3	Sequenciamento do DNA.....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1	Seleção do método de isolamento.....	26
5.2	Triagem dos isolados bacterianos.....	26
5.2.1	Teste de coloração de Gram e atividade da catalase.....	26

5.3	Avaliação do potencial probiótico.....	29
5.3.1	Avaliação de sensibilidade aos diferentes pHs.....	29
5.3.2	Avaliação do antagonismo contra patógenos.....	30
5.4	Identificação molecular.....	33
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Sabemos que os solos são ambientes com vasta diversidade de microrganismos e com grande parte de sua riqueza permanecendo desconhecida, o que gera inquietude nos pesquisadores que buscam novas fontes, para investigar esta variedade de espécies, que representam assim novos desafios e descobertas.

Observa-se também que, a Caatinga é um ecossistema exclusivamente brasileiro, caracterizado por apresentar clima semiárido e episódios de seca, sendo ainda escassos os trabalhos voltados para explorar e avaliar o potencial genético e metabólico dos microrganismos presentes no solo desse ambiente.

Dado o atual interesse na busca de microrganismos benéficos ao homem, surgem os probióticos que são microrganismos vivos que promovem equilíbrio intestinal, benefícios à saúde e qualidade de vida ao indivíduo (BRASIL, 2002).

Sendo assim, diferentes fontes tem sido investigadas com o intuito de identificar espécies microbianas com atividade probiótica. Os estudos mais recentes desenvolvidos com bactérias do solo que abordam identificação e avaliação do potencial probiótico, foram realizados com solo de regiões da Turquia e Rússia (ASLIM; SAGLAM; BEYATLI, 2002), do Japão e Taiwan (CHEN; YANAGIDA; SHINOHARA, 2005), com solo de pastagem da Turquia (YILMAZ; SORAN; BEYATLI, 2006), com solo do Himalaia (ISLAM et al., 2011) e com solo da região amazônica (COELHO, 2013).

Diante disto, percebe-se que são escassos os trabalhos que relatam a ocorrência de bactérias com potencial probiótico em regiões semiáridas, logo estudos que busquem identificá-las, avaliando o seu potencial probiótico, poderão contribuir para exploração de novas matrizes alimentícias, auxiliando no crescimento da produção de novos alimentos funcionais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A busca por uma alimentação saudável que proporcione benefícios ao ser humano, tem estimulado pesquisadores e profissionais da saúde a investigar novas fontes a procura de substâncias bioativas e alimentos funcionais. O conceito de alimento funcional teve origem no Japão na década de 80, sendo denominados como alimentos que promovem benefícios específicos a saúde, é requerido que os mesmos apresentem funções nutricionais, sensoriais e alimentícias através do consumo em quantidades ingeridas diariamente (KWAK; JUKES, 2001; YAMAGUCHI, 2006).

De acordo com a ADA (*American Dietetic Association*) alimentos funcionais são classificados como: alimentos convencionais, alimentos modificados como por exemplo, os fortificados e enriquecidos onde estão inclusos os probióticos, e os alimentos dietéticos para uso especial (HASLER e BROWN, 2004).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde e bem-estar ao hospedeiro (SANDERS, 2003). Segundo a Agência Nacional de Segurança Sanitária (ANVISA), eles são categorizados junto as substâncias bioativas que são nutrientes ou compostos não nutrientes que desempenham reações metabólicas ou fisiológicas que permitem o desenvolvimento, reparação e a manutenção dos processos vitais a vida. A quantidade recomendada para o consumo varia de acordo com a cepa empregada, seu modo de ação, se está veiculada a uma matriz alimentar ou como fármaco e também de acordo com objetivo de uso da cepa (ANVISA, 2008).

### 2.1 Microrganismos probióticos: definição e critérios de seleção

Os primeiros estudos científicos voltados a elucidar o papel dos microrganismos, foram desenvolvidos pelo microbiologista russo Eli Metchnikoff, no início do século XX, o qual propôs que o consumo diário de produtos fermentados promovia efeitos benéficos à saúde e isso ocorria porque as bactérias presentes no leite aliviavam os efeitos prejudiciais dos microrganismos patógenos, e como consequência prolongava a vida dos camponeses búlgaros (FERNANDES, 2013).

Parker (1974) definiu os probióticos como organismos e substâncias que promovem o equilíbrio intestinal. Também foram conceituados por Fuller (1989) como suplemento alimentar composto de microrganismos vivos que trazem benefícios ao hospedeiro. De acordo com Havenaar e Huis (1992) trata-se de uma cultura viável de um ou mais microrganismos

vivos, que se aplicados ao homem e aos animais, promovem benefícios à saúde e também melhoram a microbiota nativa.

Esse termo recebeu várias definições, modificadas ou atualizadas de acordo com a visão dos pesquisadores e de acordo com o avanço das pesquisas nessa área (ANADÓN et al., 2016).

Entretanto, mesmo com o desenvolvimento exponencial dos estudos voltados a avaliar o potencial probiótico, não havia consenso internacional sobre qual metodologia poderia avaliar de forma eficaz que garantisse segurança aos produtos probióticos para serem consumidos pela população. No entanto, em 2002, foram delimitados esses requisitos a partir de um consenso entre os principais pesquisadores da área, que se reuniram e estabeleceram os critérios de segurança alimentar e /ou terapêutica dos probióticos (FAO e WHO, 2002).

Foi proposto, inicialmente, que deve ser feita a identificação genotípica e fenotípica da cepa de interesse, determinando o gênero, espécie e subtipo, em seguida deve ser depositada em um banco de dados internacional de culturas. Após a identificação deve-se realizar a avaliação de segurança, quando é feita a caracterização funcional *in vitro* e em animais, através de ensaios que avaliam a resistência dos microrganismos ao pH ácido do suco gástrico e a sais de bile, na sua capacidade de aderência a mucosa intestinal assim como, na sua capacidade de agir antagonicamente contra patógenos e de estimular a resposta imune (RODRÍGUEZ, 2015).

Para validação dos benefícios à saúde em humanos, é necessário determinar a quantidade de microrganismos necessárias para proporcionar tais efeitos ao ser humano. No rótulo do produto deve conter informações da cepa utilizada (gênero, espécie), número mínimo de células viáveis durante o armazenamento, indicação da vida útil e a alegação da eficácia do produto (SANZ; COLLADO; DALMAU, 2003).

Para que esses microrganismos sejam aplicados em seres humanos, devem ser veiculados à uma matriz alimentar ou como um fármaco, é necessário comprovar sua eficácia como probiótico. Para isto, aplica-se o teste duplo cego e controlado com placebo. Há espécies de probióticos com eficácia comprovada, podendo ser utilizadas não só como reguladores da saúde intestinal, mas também no tratamento de algumas doenças. Uma série de benefícios são promovidos pelos microrganismos probióticos a nível intestinal: funcionando como uma barreira contra colonização por patógenos, modulando a resposta imune da mucosa intestinal, produzindo substâncias antimicrobianas e alterando a composição da microbiota e atuando de forma direta ou indireta modificando positivamente o metabolismo humano (EWASCHUK e DIELEMAN, 2006).

## 2.2 Benefícios e mecanismos de ação dos probióticos

Os probióticos propiciam benefícios promovendo o bem-estar e a saúde dos consumidores, podendo ser denominados bioterapêuticos, bioprotetores e bioprolifáticos (REIG e ANESTO, 2002).

Seus principais mecanismos de ação podem ser resumidos como: exclusão competitiva de microrganismos patogênicos, alteração do metabolismo celular a nível intestinal, produção de substâncias de interesse ao hospedeiro como vitaminas e ácidos de cadeia curta e estímulo a imunidade do mesmo (FULLER, 1989; COPPOLA e GIL-TURNES, 2004).

Sabe-se que os microrganismos probióticos agem por exclusão competitiva, seja por nutrientes ou inibindo a adesão dos patógenos ao epitélio intestinal, além de terem a capacidade de agir de forma antagônica contra patógenos, como cita Santos et al. (2016), há evidências que dois espécimes de *Lactobacillus plantarum* inibiram os patógenos *Salmonella typhi*, *Shigella flexi* e *Escheria coli* patogênica. Essa ação inibitória contra os patógenos está associada à produção de metabólitos secundários e substâncias antimicrobianas pelos probióticos. Segundo Arena et al. (2016) as bactérias ácido lácticas são bastante estudadas por sua capacidade de produzir ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido láctico e o ácido acético, substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas. Outras BAL como o *L. reuteri* tem forte capacidade antagônica associada a possível produção de ácidos orgânicos por esses microrganismos (POPPI et al., 2008). Nos estudos desenvolvidos por a Castilho, Da Cunha e Araújo (2013) e Argyri et al. (2013), relatou-se o antagonismo a patógenos de interesse alimentar como *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli* patogênica e *L. monocytogenes* pelas espécies de *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei subsp. casei*.

Outro mecanismo de atuação dos probióticos é o controle do metabolismo celular, que ocorre através do aumento ou diminuição da atividade enzimática, como por exemplo, agindo no controle da atividade da enzima lactase no duodeno e no íleo terminal, melhorando assim a digestão por meio da hidrólise da lactose, bloqueando receptores de toxinas, agindo também na degradação de substâncias tóxicas ao organismo como a amônia (KOZASA, 1986; VRESE et al., 2001; PIMENTEL, 2011).

Atuam na síntese de substâncias de interesse ao hospedeiro como as vitaminas do complexo B, que funcionam como coenzimas do metabolismo celular. Há relatos de produção das vitaminas hidrossolúveis: B<sub>1</sub> - tiamina, B<sub>3</sub> - ácido nicotínico, B<sub>6</sub> - piridoxina, B<sub>9</sub> - folato e B<sub>12</sub> - cobalamina por bactérias do gênero *Bifidobacterium* (DEGUCHI; MORISHITA; MUTAI, 1985), como também a síntese por bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e

*Streptococcus*, como por exemplo a vitamina B<sub>2</sub> - riboflavina pelo *L. plantarum* (ARENA et al., 2014; LI e GU, 2016) e *L. fermentum* (ARENA et al., 2014), a B<sub>12</sub> - cobalamina sendo sintetizada pelo *L. reuteri* (GU et al., 2015) e B<sub>9</sub> - folato pelo *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Leuconostoc lactis*, e *Streptococcus thermophilus* (KLEEREBEZEM et al., 2003; WEGKAMP et al., 2010; LEBLANC et al., 2011).

As BAL também produzem vitaminas lipossolúveis do complexo K, como por exemplo K<sub>1</sub> (filoquinona) em geral, oriundas de plantas verdes e óleos vegetais e K<sub>2</sub> (menaquinona) obtidas através de bactérias do trato intestinal humano e animal. São importantes na síntese hepática de proteínas envolvidas na coagulação sanguínea, na produção de proteínas responsáveis pelo crescimento celular e na regulação do cálcio durante o processo de calcificação dos tecidos ósseos (DANTAS et al., 2012).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são produzidos pelas bactérias intestinais que fermentam carboidratos e proteínas não digeríveis pelo intestino delgado, resultando na produção dos AGCC no intestino grosso como o acetado, butirato e propionato (CAMPOS et al., 1999). Estes ácidos são fonte de energia para os enterócitos, reduzem o pH intestinal ocasionando o aumento na concentração de minerais como o cálcio e tornando-o mais solúvel por melhorar sua biodisponibilidade. Aumentam a absorção de ferro, magnésio, água e sódio pelo epitélio intestinal e protegem a mucosa do colón contra patologias (SAAD, 2006).

Auxiliam na manutenção do pH ideal para que sejam produzidas enzimas bacterianas que agem sobre substâncias estranhas, microrganismos patogênicos e compostos carcinógenos (KOPP-HOOLIHAN, 2001). Como exemplo, pode-se citar a produção de butirato pelas BAL, sendo capaz de neutralizar a ação de compostos carcinogênicos, como nitrosamidas que são resultantes do metabolismo de bactérias comensais de indivíduos que se alimentam com dieta com teor alto em proteínas (WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001).

Também atuam estimulando a imunidade do hospedeiro, através da modulação de respostas imunes, influenciando na produção de anticorpos e aumentando a atividade dos macrófagos. A pesquisa desenvolvida por Jatobá et al. (2008) com tilápias do Nilo, resultou na melhora do sistema imune dos peixes com suplementação alimentar a base de *L. plantarum* e inibição de bactérias patogênicas do trato intestinal como *Vibrio ssp.* e *Pseudomonas spp.* De acordo com Woo et al. (2014), espécies de *Lactobacillus sp.* são aplicadas no tratamento de doenças crônicas como por exemplo Alzheimer e Parkinson, como também reduzem riscos cardiovasculares como a hipertensão, diabetes e obesidade. Além disso promovem a redução dos sintomas de doenças como a síndrome do intestino irritável (SAAD, 2006; VRIES et al., 2006; MORAES, 2007; JANKOVIC et al., 2010). Estudos comprovaram, ainda, que a

estimulação do sistema imune está associada com efeitos anticarcinogênicos. Dentre esses estudos estão: a indução a resposta tumoral e ativação de macrófagos com *Lactobacillus casei* e supressão da formação de tumores de cólon em camundongos (KATO; ENDO; YOKOKURA, 1994), e a inibição de metástases pulmonares (MATSUZAKI; SHIMIZU; YOKOKURA, 1990).

Os probióticos apresentam efeitos hipocolesterolêmicos no organismo e de acordo Shehata et al. (2016) a espécie *Lactococcus lactis subsp. lactis* apresentou o maior percentual de remoção de colesterol (cerca de 43,7%) e ainda possui a capacidade de hidrolisar sais biliares. As BAL possuem a capacidade de produzir ácidos voláteis no cólon, e ao serem absorvidos pelo organismo promovem a inibição do metabolismo do colesterol pelo fígado (STEFÉ; ALVES; RIBEIRO, 2008).

### 2.3 Bactérias e suas aplicações como probióticos

Os principais gêneros bacterianos empregados para fins probióticos fazem parte do grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e os que possuem maior destaque são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. A preferência por esses gêneros está associada ao fato de grande parte das linhagens bacterianas terem o status GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), além de serem usados há bastante tempo e de forma segura em produtos fermentados (PRASAD et al., 1998).

Entretanto há outros gêneros de BAL, como *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* e bactérias não ácido lácticas do gênero *Bacillus* que também possuem aplicações probióticas (SALMINEN e VON WRIGHT, 1998; SANDERS; MORELLI; TOMPKINS, 2003; HONG et al., 2008).

#### 2.3.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

A denominação bactérias ácido lácticas, surgiu no século XX, afim de agrupar gêneros bacterianos que possuem a mesma capacidade metabólica, ou seja, a capacidade de produzir ácido láctico a partir da fermentação de açúcares. Este grupo engloba as espécies dos gêneros: *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AHMED, 2003; JAY; LOESSENER; GOLDEN, 2005; BARTOWSKY, 2009).

Estes microrganismos são caracterizados por serem Gram positivos, catalase negativos, não apresentarem mobilidade, não esporularem, não possuem citocromos, são anaeróbicos, fastidiosos, podem ser aerotolerantes e produtores de ácido lático (TORO, 2005).

Quanto à morfologia, possuem o formato de cocos, bacilos ou bastões regulares ou irregulares. Os cocos possuem forma esférica com tamanho variando entre 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  em pares, tétrades ou cadeias com número variado. Esta disposição varia com os gêneros, sendo que *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* apresentam-se em pares ou cadeias, enquanto organismos do gênero *Leuconostoc* possuem formatos lenticulares em pares ou cadeias e os gêneros *Pediococcus* e *Tetragenococcus* as células estão dispostas em tétrades (ALEXON, 1998).

Quanto ao metabolismo fermentativo os gêneros também possuem distinções. Os microrganismos dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* são caracterizados por apresentarem metabolismo homofermentativo, fermentando glicose em ácido lático. Os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* são heterofermentativos, ou seja, fermentam hexoses em ácido lático, ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Enquanto as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* podem ser homofermentativos ou heterofermentativos obrigatórios. As heterofermentativas obrigatórias diferenciam-se das heterofermentativas facultativas, por fermentam hexoses em ácido lático com a produção de gás utilizando o gliconato (BURITI e SAAD, 2007; CHAVES, 2013).

### 2.3.1.1 Uso das bactérias ácido lácticas como probióticos

As bactérias ácido lácticas estão presentes em alimentos e em preparações farmacêuticas. Nos alimentos são encontradas em produtos lácteos fermentados ou suplementados como por exemplo iogurte, leite acidófilo, queijos, derivados de frutas, dentre outros. Nas preparações farmacêuticas geralmente estão liofilizadas e ofertadas também na forma de cápsula ou sachê, tanto para uso humano quanto animal (GARCIA et al., 2016; VIEIRA et al., 2007).

São utilizadas na medicina para prevenir e tratar doenças gastrointestinais como diarreia, câncer de cólon, doença de *Crohn*, síndrome do intestino irritável, síndrome do intestino curto e intolerância à lactose. Também podem ser utilizadas em outras aplicações clínicas, como por exemplo, no controle do colesterol atenuando o risco de doenças cardiovasculares e controle da obesidade (EVIVIE et al., 2017)

Também são empregadas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas do intestino e outras patologias gastrointestinais, como por exemplo, no tratamento da doença de Crohn está sendo usado o *Lactobacillus casei*, no tratamento da síndrome do intestino irritável utiliza-se o *L. plantarum* e o *L. rhamnosus GG* e notou-se a melhora dos sintomas da doença que são diarreia, constipação, flatulência e dores abdominais. Já na síndrome do intestino curto, que gera redução da permeabilidade intestinal, o uso dos probióticos auxiliaram na recuperação do intestino. No tratamento do câncer do cólon e prevenção do câncer de colorretal de antimutagênicos. Utiliza-se a cepa de *L. rhamnosus* que também é indicada para indivíduos com intolerância à lactose. Os probióticos estimulam a produção da enzima beta-galactosidase que reflete na diminuição dos sintomas como distensão abdominal, diarreia e flatulência (ANTUNES et al., 2007; VARALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008; PIMENTEL, 2011; PITHVA et al., 2015).

Algumas espécies tem a capacidade de auxiliar no controle do colesterol, agindo por meio da inibição da absorção exógena de colesterol pelo intestino delgado ou pela hidrólise dos ácidos biliares, ou até mesmo aumentando sua excreção pelas fezes e ainda podem reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, como na diminuição da incidência de infarto e aterosclerose (ANTUNES et al., 2007; SHEHATA et al., 2016). Na pesquisa desenvolvida por Evivie et al. (2017) foi relatado potencial dos probióticos na prevenção da obesidade e também para tratamento do diabetes tipo 2.

Li, Zhou e Gu (2016) evidenciaram a produção de vitaminas do complexo B e K pelas bactérias ácido lácticas e exemplificou a cepa de *Lactobacillus plantarum*, oriunda do leite de vaca cru, com prospecção para indústria alimentícia, como também no controle metabolismo humano e na prevenção de distúrbios associados com a deficiência da vitamina B.

Ainda Priyodip et al. (2017) relatam que os probióticos podem ser utilizados na produção de fitases, sendo essas espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* como: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *B. subtilis* e *B. coagulans*. A fitase é uma enzima capaz de degradar fitatos e os seres humanos são incapazes de produzi-la, sendo esta enzima uma saída no combate da deficiência mineral.

### 2.3.2 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi descrito em 1872 por Ferdinand Cohn, como microrganismos com formato de bastões ou hastes, Gram positivos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, imóveis, e formadores de esporos (EUZÉBY, 2017). Sendo representados por 336 espécies e 7

subespécies, que habitam uma grande diversidade de nichos como: solos, associados a plantas, rios, estuários, poeira e o ar (TAM et al., 2006; HONG et al., 2009; COELHO, 2013).

Apresentam intensa atividade metabólica, visto que produzem enzimas que são capazes de degradar diversos substratos orgânicos, além de desempenharem um papel importante no crescimento e segurança de plantas, têm a capacidade de liberar esporos que são resistentes ao calor, a radiação, desinfetantes e dessecação (CUTTING, 2011).

São capazes de produzir vitaminas hidrossolúveis do complexo B como: B<sub>2</sub> - riboflavina (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004; GERSHANOVICH et al. 2005; SCHWECHHEIMER et al., 2016), a vitamina B<sub>6</sub> - piridoxina (ROSENBERG; ISCHEBECK; COMMICHAU, 2017), da B<sub>9</sub> - folato (KARILUOTO et al. 2010) pelo *B. subtilis* e da vitamina B<sub>12</sub> - cobalamina pelo *B. megaterium* (MOHAMMED et al., 2014). Também sintetizam vitaminas lipossolúveis do complexo K como cita RUIZ-GARCIA et al. (2005) que evidenciam a produção da K<sub>2</sub> - metaquinona MK-7 pelo *Bacillus axarquiensis* e o *Bacillus malacitensis*. Além da capacidade de produzir vitaminas o *B. subtilis* destaca-se na produção de nucleotídeos, aromatizantes como a ribose e na produção de suplementos como o ácido poli gama glutâmico (GERSHANOVICH et al., 2005).

Há bactérias do gênero *Bacillus* que se destacam pela sua capacidade de produção de compostos antimicrobianos, como por exemplo o *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (MONDOL; SHIN; ISLAM, 2013). Esta ação antimicrobiana é fruto da produção de bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos e metabólitos secundários (ZHAO e KUIPERS, 2016). Como por exemplo, na produção de uma bacteriocina pelo *B. licheniformis* que inibiu bactérias Gram positivas como a *Listeria monocytogenes* e Gram negativas como a *Pseudomonas fluorescens* (ABDEL-MOHSEIN et al., 2011). Zhi et al. (2016) relatam a capacidade de produção de um lipopeptídeo antimicrobiano pelas espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* contra *Streptomyces sampsonii* que é patógeno deteriorante do licor chinês. Há espécies que agem antagonicamente contra fitopatógenos como por exemplo, o *Bacillus toyonensis* (LOPES et al., 2017) e também o *B. amyloliquefaciens* que sintetiza antibióticos potentes e outros metabólitos secundários que agem no controle biológico de patógenos das plantas (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009).

Também estão presentes na microbiota gastrointestinal humana de forma transitória, sendo adquiridos durante a alimentação (HONG et al., 2009). Foi realizado um estudo com quatro voluntários que ingeriram uma dose de 10<sup>5</sup> esporos de *B. stearothermophilus* com a finalidade de avaliar sua cinética no trânsito gastrointestinal, após quatro dias da ingestão, o número de UFC/g manteve-se constante nas fezes, apenas no oitavo dia de experimento que as

contagens de células diminuíram consideravelmente, a cinética dessa espécie do gênero *Bacillus* mostrou-se semelhante ao probiótico *Lactobacillus plantarum*, evidenciando sua capacidade de colonização, ou pelo menos de retenção no trato gastrointestinal (VESA; POCHART; MARTEAU, 2000; HONG et al., 2005).

Atualmente, os produtos probióticos contendo bactérias formadoras de esporos, utilizam em sua grande maioria *Bacillus spp.*, as quais possuem vantagens em relação as bactérias ácido lácticas, por exemplo, a produção de esporos, que sobrevivem intactos pela passagem no trato gastrointestinal e aumentam a viabilidade dos produtos durante a elaboração, transporte e armazenamento (HOA et al., 2000; CUTTING, 2011).

### 2.3.2.1 Uso de *Bacillus* como probióticos

As espécies do gênero *Bacillus* possuem importância clínica, alimentar, ambiental e industrial. As principais espécies utilizadas como esta finalidade são: *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. licheniformes*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, dentre outras (HONG; DUCLE; CUTTING, 2005).

Em sua aplicação clínica, são usadas no tratamento de disfunções intestinais, como por exemplo, em casos de diarreia infantil (causada principalmente por rotavírus) ou como coadjuvante de antimicrobianos. Dentre as espécies com esta aplicação, a mais conhecida é o *B. cereus* (IP 5832) sendo comercializada como Bactisutil®, este medicamento foi desenvolvido no Instituto Pasteur de Paris, onde foram realizados ensaios clínicos com recém-nascidos sendo comprovada sua eficácia (DUC et al., 2004).

Há culturas de *Bacillus spp.* sendo utilizadas para reduzir os efeitos secundários do tratamento antimicrobiano contra *Helicobacter pylori* (LOPETUSO et al., 2016), para atenuar os sintomas da síndrome intestino irritável (MORAES-FILHO e QUIGLEY, 2015), no tratamento antitumoral (MALKOV et al., 2005) e no tratamento de infecções respiratórias em crianças (MARSEGLIA et al., 2007).

Como suplemento alimentar, nos últimos 15 anos as espécies de *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformes*, *B. pumilus* são empregadas para o uso humano e animal com a finalidade de promover o bem-estar do usuário, restituir a microbiota nativa e outras funções. Um exemplo de suplemento alimentar para consumo humano, tem origem japonesa sendo denominado como “natto”, este produto é composto de soja fermentada pelo *B. subtilis var. natto*. Os principais benefícios são estimular o sistema imune, a produção de vitaminas, como

a K<sub>2</sub> e atividade anti-cancerígena (HONG; DUCLE; CUTTING, 2005; TSUKAMOTO; KASAI; KAKUDA, 2001).

Para fins veterinários, são utilizados para porcos, bezerros, aves e na aquicultura como por exemplo, o uso de *B. cereus var. toyoi* na dieta de porcas no fim da gestação e da lactação, assim como na dieta de leitões no momento do desmame, proporcionando efeitos benéficos no sistema imune dos mesmos, visto que aumentaram os níveis das células de defesa permitindo assim o desenvolvimento dos leitões (ALEXOPOULOS et al., 2001). De acordo com Garcia (2008) o *B. subtilis* é bom promotor do crescimento animal, visto que obteve resultado semelhante com bezerros. Empregando a mesma espécie Thirabunyanon e Thongwittaya (2012) evidenciaram o potencial probiótico desse microrganismo em aves, impedindo que a *Salmonella enteritidis* causasse infecção por exclusão competitiva. Na aquicultura a suplementação com *B. cereus* e *B. subtilis* interferiu significativamente na sobrevivência relativa, induzindo o aumento da absorção da mucosa intestinal e contribuindo para defesa frente a bactérias prejudiciais à mucosa (MELLO et al., 2013).

De acordo com Robinson (2014) as espécies *B. thuringiensis* e o *B. cereus* são uma alternativa segura e não tóxica ao meio ambiente para o controle de insetos, em contraste aos agentes de controle químico com pesticidas. Para fins industriais este mesmo autor relata que espécies de *B. subtilis* e *B. licheniformes* são amplamente utilizadas na produção de enzimas como amilases, celulasas, lipases e proteases. Sendo empregadas pelas indústrias no processamento de alimentos e medicamentos, e também sendo utilizadas para catalisar reações de fermentação industrial.

Há espécies do gênero *Bacillus* que também tem a capacidade de sintetizar fitases como *B. subtilis* e *B. coagulans* (PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017). A espécie *Bacillus ginsengihumi* isolada por Ten et al. (2006) possui características peculiares dos demais *Bacillus spp.* o mesmo não produz enzima catalase, sobrevive a temperaturas de 20 a 45°C e ao pH de 5 a 10. Na pesquisa desenvolvida por Akhmetova et al. (2013) com esta espécie, resultou na caracterização da enzima fitase, tendo essa aplicação para fertilização do solo visto que as fitases hidrolisam fitatos disponibilizando fósforo para o solo e permitindo uma melhor produtividade agrícola. Atua melhorando a absorção de minerais em indivíduos monogástricos como é o caso dos seres humanos, aves e suínos. Sharipova et al. (2015) utilizaram-se de ferramentas da engenharia genética, para criar uma planta, *Arabidopsis thaliana* transgênica, com a capacidade de expressão de fitases produzidas pelo *B. ginsengihumi* em suas raízes, afim de garantir melhor rendimento das plantas e uma agricultura mais sustentável sem o emprego de agrotóxicos.

Portanto, a busca por estudar novas espécies de microrganismos em novos *habitats*, nos permite investigar a diversidade genética, metabólica e também seu potencial probiótico, conferindo uma ampla diversidade de aplicações, estimulando novas pesquisas e descobertas para humanidade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

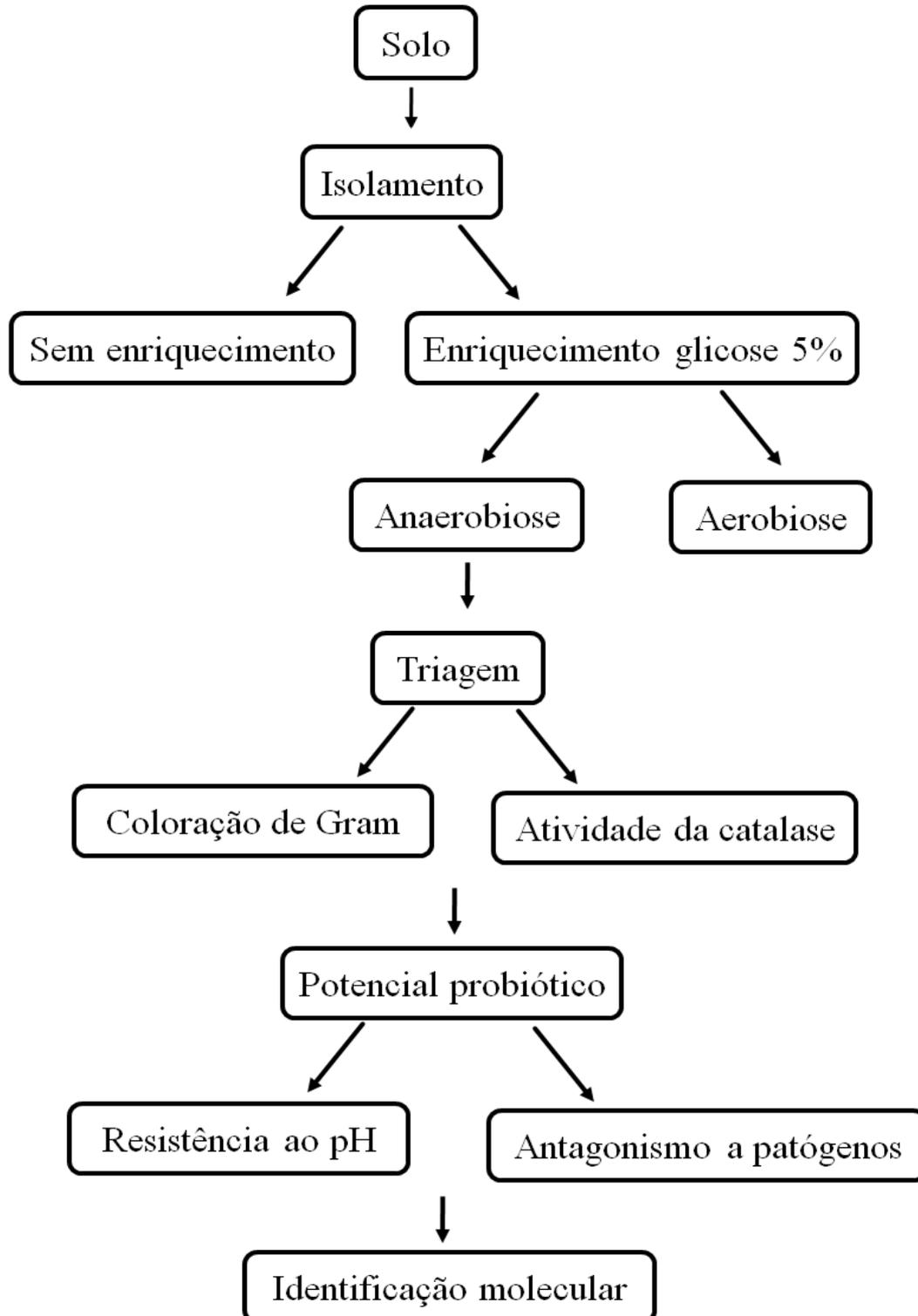
Identificar bactérias presentes no solo semiárido paraibano com potencial probiótico.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Selecionar um método adequado para isolamento e cultivo de bactérias;
- ✓ Utilizar características morfológicas para especificação das linhagens bacterianas;
- ✓ Avaliar as características probióticas das cepas triadas;
- ✓ Identificar as espécies candidatas a probióticos;

#### 4 MATERIAIS E METÓDOS

**Figura 1-** Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no estudo



#### 4.1 Área de coleta

O solo da região sertaneja paraibana utilizada para coleta foi a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), pertencente à Fazenda Tamanduá no município de Santa Terezinha - PB. O clima conforme a classificação de Köppen é do tipo Bsh semiárido (DE ANDRADE et al., 2008). Segundo Araújo (2000) a área de coleta caracteriza-se por apresentar uma estação seca (maio – janeiro) e outra chuvosa (fevereiro – abril), com pluviosidade média anual inferior a 800 mm/ano, temperatura média anual superior a 25°C e a vegetação é de caatinga arbustiva-arbórea fechada. A figura 2 mostra a localização do local de coleta.

**Figura 2 -** Localização da área de coleta no estado da Paraíba



Fonte: Adaptação do Google Maps.

##### 4.1.1 Coleta das amostras de solo

As amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0 a 20cm e inseridos assepticamente em sacos plásticos esterilizados e transportados para o laboratório na temperatura de 4° C. Foram coletadas dez amostras, as quais foram submetidas a sorteio, das quais, quatro sub amostras (1, 5, 7 e 9) foram selecionadas com intuito de estudá-las.

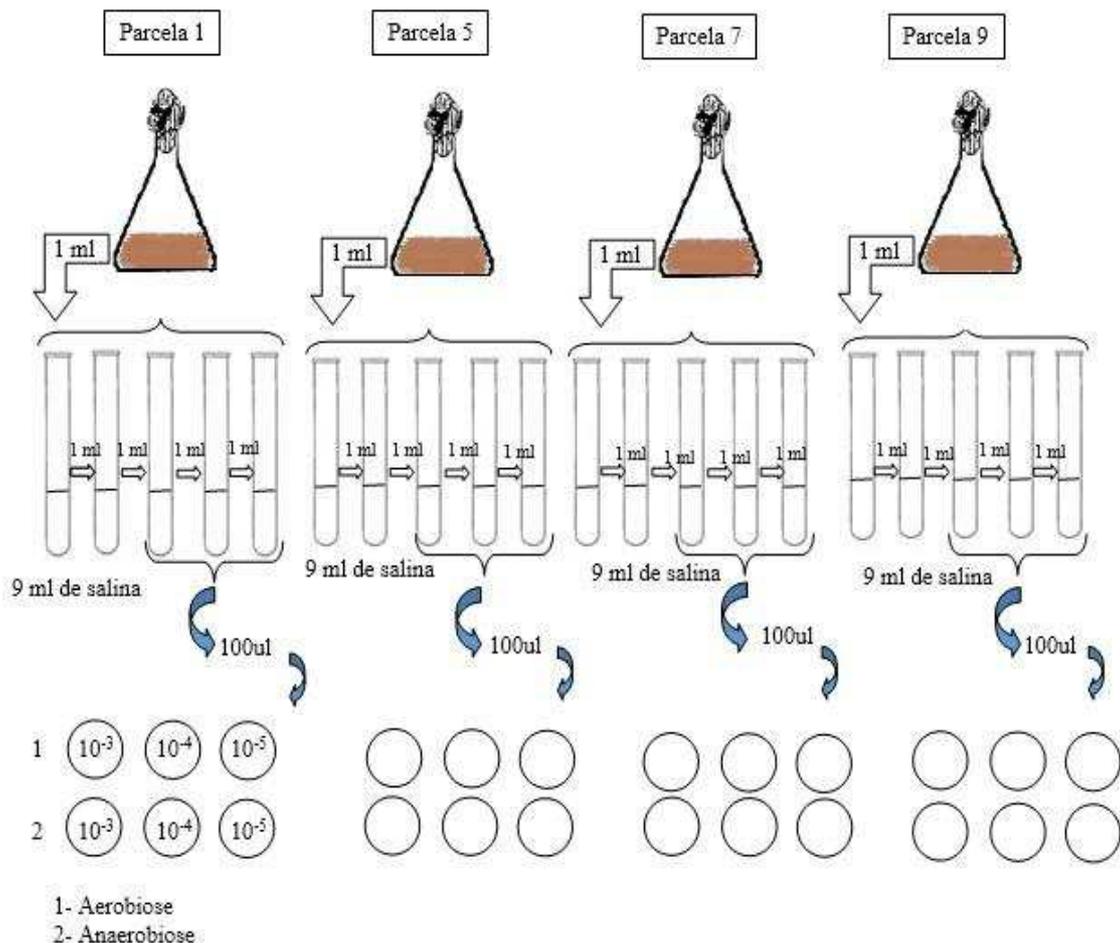
##### 4.2 Isolamento bacteriano

Para o isolamento de bactérias utilizaram-se duas metodologias, a saber: sem enriquecimento, e com enriquecimento de glicose a 5% utilizando a proposta adaptada de

Soares Jr. et al. (2012), sendo cultivadas em aerobiose e anaerobiose utilizando jarras de cultivo em anaerobiose, sendo avaliado o método eficaz para cultivo dos isolados bacterianos.

O procedimento consistiu em diluir 5 gramas do solo de cada parcela 1, 5, 7 e 9 em 50 ml de água destilada estéril, sob agitação por um minuto e após foi retirada uma alíquota de 1mL de cada amostra aplicando diluições seriadas até  $10^{-5}$ . Em seguida, foram realizados o plaqueamento em triplicata das três últimas diluições ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) em Ágar De Man Rogosa e Sharpe (MRS) sendo utilizado esse meio de cultivo porque ele é seletivo para *Lactobacillus* que pertencem as bactérias ácido lácticas que são um dos principais grupos utilizados como probióticos, foi suplementado com cicloheximida (50mg/mL) afim de inibir o crescimento de fungos e incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 37°C nas condições de aerobiose e anaerobiose (Figura 3).

**Figura 3 - Desenho experimental do isolamento**



Fonte: Acervo GDBM

O método de isolamento que apresentou a maior diversidade de morfologias e maior quantidade de colônias, foi selecionado para o cultivo bacteriano. As colônias escolhidas foram purificadas por esgotamento nos meios de cultura já citados e conservadas em suspensões de glicerol estéril (20%) a - 20 ° C.

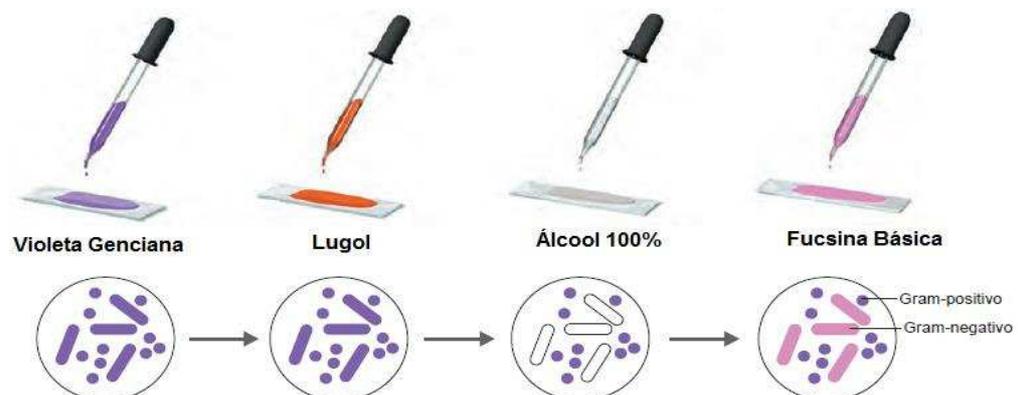
### 4.3 Triagem dos isolados bacterianos

#### 4.3.1 Coloração de Gram

O teste consiste em corar um esfregaço da colônia bacteriana de interesse, previamente fixada em uma lâmina (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012). Adiciona-se à lâmina de vidro uma gota de solução salina (0,85 g de NaCl para cada 100 ml de água destilada), em seguida uma colônia foi retirada da placa, a qual estava isolada em Ágar MRS com auxílio de uma alça bacteriológica anteriormente esterilizada na chama do bico de Busen, logo após homogeneizou-se a colônia na gota de solução salina (0,85%), logo após a lâmina foi passada rapidamente pela chama até fixar as bactérias para prosseguir para coloração.

Para coloração adicionaram-se gotas de violeta genciana (coloração primária) sobre a lâmina deixando agir por um minuto, logo, a lâmina foi lavada com água destilada, e depois acrescentou-se lugol (mordente) para fixar a coloração, também por um minuto, e lavou-se a lâmina novamente com água destilada. Posteriormente foi adicionado álcool etílico a 96% (descolorante) por 30 segundos, repetindo-se a lavagem, com água destilada, seguido de gotas de fucsina básica (coloração secundária) em repouso por um minuto (Figura 4). A lâmina foi então lavada com água destilada e observada em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão (100X) com auxílio do óleo de imersão.

**Figura 4 - Técnica de coloração de Gram**



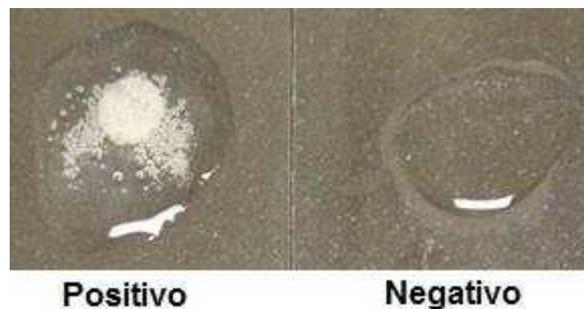
Fonte: Adaptado (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012, p. 70).

### 4.3.2 Teste de atividade da enzima catalase

Este teste tem a finalidade de identificar as cepas bacterianas que tem a capacidade de produzirem a enzima catalase. Essa enzima tem a capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio que é um composto tóxico para células, por isso deve ser convertido rapidamente para um composto que não seja prejudicial. A enzima catalase decompõem o peróxido em oxigênio e água, como resultado, ocorre a produção de bolhas de gás que expressa o resultado positivo, mas quando essa reação não ocorre o resultado é negativo. Esse método foi baseado em (VASHIST; SHARMA; GUPTA, 2013).

A realização do teste consiste na homogeneização de uma alçada da cepa bacteriana na lâmina de vidro, utilizando uma gota de água destilada ou solução salina estéril (0,85%) que é fixada na lâmina passando-a pela chama. Em seguida, adiciona-se sobre a lâmina uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, aguardando a formação ou não de bolhas de gás (Figura 5).

**Figura 5 -** Teste de atividade da enzima catalase



Fonte: Acervo GDBM

## 4.4 Avaliação do potencial probiótico

### 4.4.1 Teste de sensibilidade ao pH

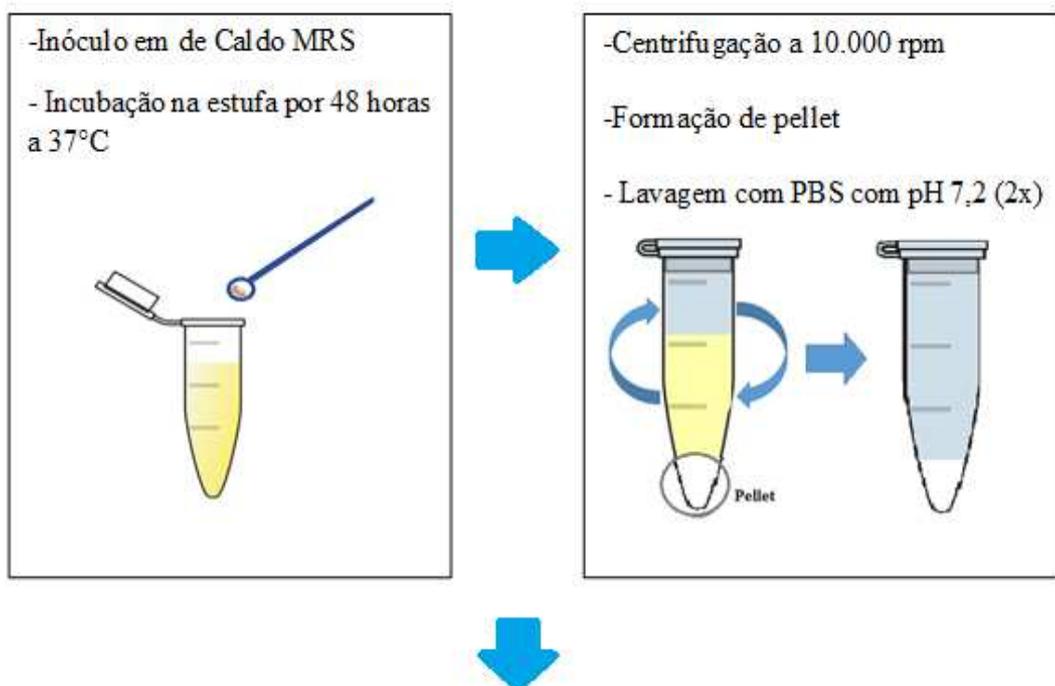
O teste de sensibilidade aos diferentes pHs, seguiu a metodologia com adaptações de (JACOBSEN et al., 1999). Esse teste consistiu em introduzir uma alçada da colônia bacteriana (10 $\mu$ L) em 2mL de Caldo MRS contidos em um eppendorf, que foi incubado na estufa por até 48 horas a 37°C. Após este período, verificou-se a multiplicação visível do microrganismo, centrifugou-se por cerca de 3 minutos a 10.000 rpm para que se formasse o pellet. Desprezou-se o sobrenadante e foi adicionado no eppendorf cerca de 1 ml de solução salina tamponada

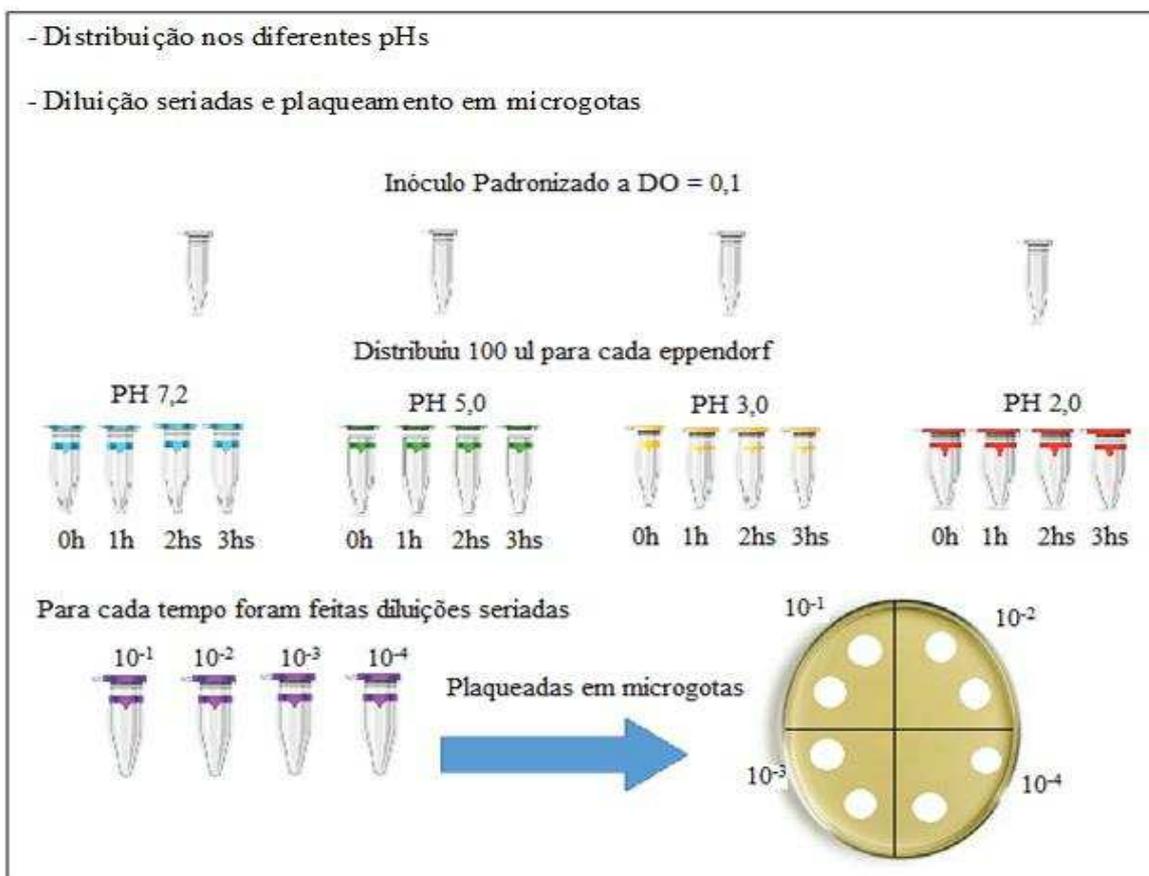
com fosfato (PBS), com pH previamente ajustado com ácido clorídrico (HCL 0,1 M) para 7,2 sendo utilizado como controle negativo. Logo após, homogeneizou-se a amostra no vórtex e repetiu-se o mesmo processo de centrifugação e lavagem com PBS por duas vezes.

O inóculo seguiu para padronização, em que foi medida a absorbância com espectrofotômetro, com a DO (Densidade óptica) de 625 nanômetros (nm) = 0,1. Esta leitura foi realizada com uso de uma cubeta com solução salina (branco) que é utilizada como controle, e em outra cubeta colocou-se 800µL de solução salina (0,85%) e adicionou-se 200µL do inóculo.

A partir do inóculo padronizado a uma DO=0,1, distribui-se cerca de 100µL do inóculo nos diferentes valores de PBS ajustados aos pHs 2, 3 e 7,2 sendo avaliada a tolerância das cepas para cada pH nos tempos 0 e 3 horas. Após terem sido distribuídas nos eppendorfs, as amostras foram colocadas na estufa nos tempos de 1 a 3 horas. Após a exposição dos isolados às soluções de PBS com diferentes valores e após cada tempo de incubação foi tomada uma alíquota de cada uma para avaliação da viabilidade celular. As amostras foram diluídas até  $10^{-4}$  e a avaliação da viabilidade foi realizada aplicando-se a técnica da micro gota. As placas inoculadas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas. Os resultados foram expressos com a presença (+) ou ausência (-) de multiplicação bacteriana visível. A figura 6 ilustra os métodos utilizados para realização desde teste.

**Figura 6** - Ilustrações dos métodos utilizados no teste de sensibilidade a pHs





#### 4.4.2 Antagonismo a patógenos

Este teste avalia o potencial antagonico dos isolados bacterianos aos patógenos: *Salmonella enterica subsp. typhi* (ATCC 14028), *Salmonella entérica subsp. enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* enteropatogênica (ATCC 8739). O método aplicado foi ágar *spot test* baseado em (JACOBSEN et al. 1999). O experimento foi desenvolvido da seguinte forma:

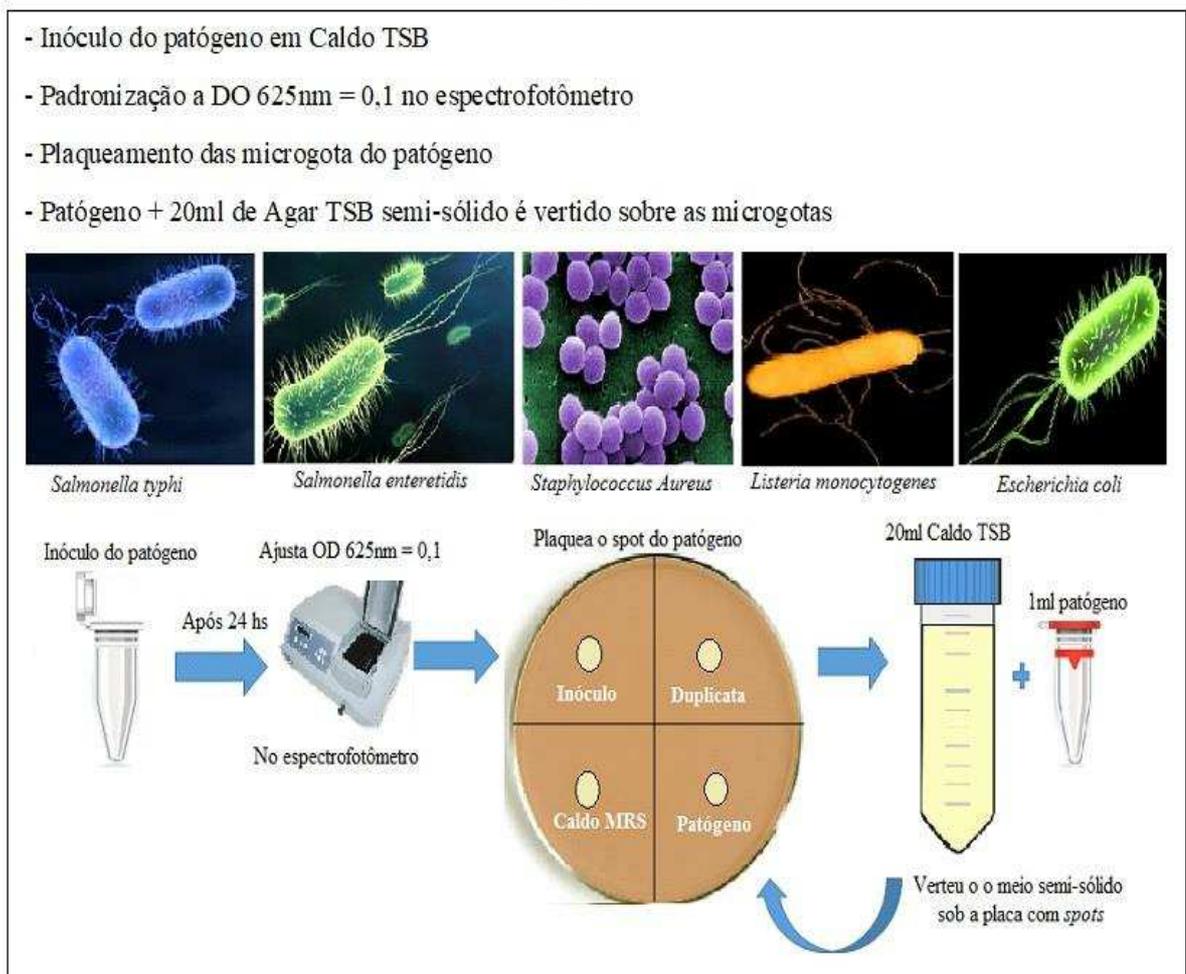
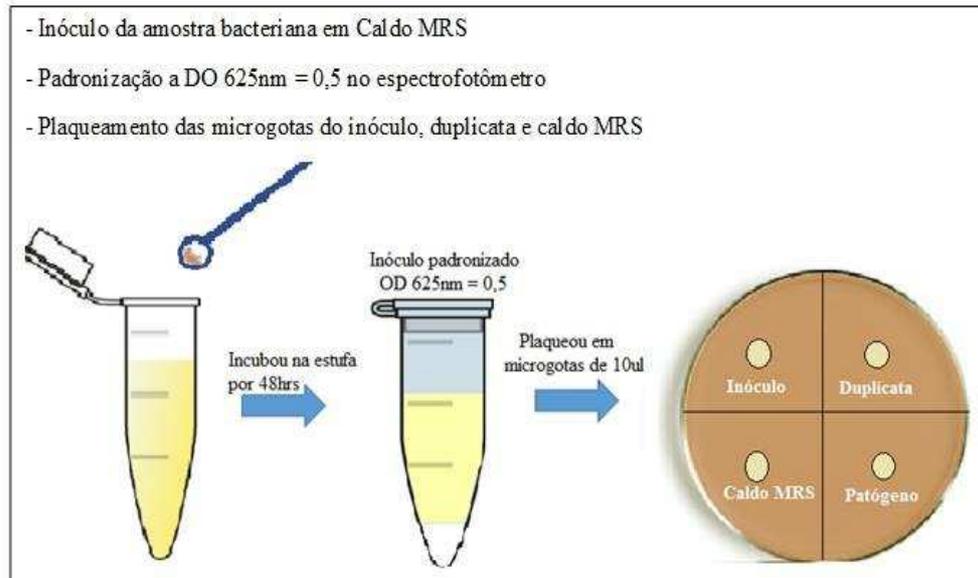
Realizou-se a inoculação do isolado de interesse, com uma alça bacteriológica (10 $\mu$ L) em 1mL de caldo MRS estéril, logo após incubou-se por 48 horas a 37°C na estufa bacteriológica. Passada as 48 horas ajustou-se o inóculo a uma DO 625nm = 0,5 no espectrofotômetro.

Com o inóculo ajustado a DO específica, homogeneizou-se no vórtex e coletaram-se 10 $\mu$ L do inóculo ajustado e plaqueou-se o *spot* em duplicata na placa de Ágar MRS. Na mesma placa adicionou um *spot* com 10 $\mu$ L de caldo MRS estéril para ser o controle negativo. Então incubou-se na estufa em anaerobiose de 24 a 48 horas a 37° C.

Após o período de incubação, foi realizado o inóculo da bactéria patogênica, onde foi coletada uma alçada (10 $\mu$ L) do estoque congelado contendo da bactéria de interesse em suspensão com glicerol a 20%, inóculada em 1 ml de caldo de Triptona de Soja (TSB) e incubada a 37°C por 24 horas. Tendo transcorrido o período de incubação ajustou-se o inóculo da bactéria patogênica a uma DO 625nm = 0,1. Com inóculo ajustado, adicionou-se um *spot* de 10 $\mu$ L da bactéria patogênica na placa de Ágar MRS para atuar também como controle negativo.

Cerca de 1mL do caldo ajustado contendo a bactéria patogênica, foi inserido em um tubo contendo 20 mL de Ágar TSB a 0,7%, agitou-se no vórtex e verteu-se sobre a placa com os *spots*, após, incubou-se a 37°C por 24 horas. Com auxílio de um paquímetro mediu-se o diâmetro em milímetros (mm) da zona de inibição, sendo considerada atividade antagonista positiva, quando halo de inibição foi maior que 1 milímetro (JACOBSEN et al., 1999). A figura 7 ilustra o passo a passo dos métodos empregados neste experimento.

**Figura 7 - Ilustrações dos métodos utilizados no teste de antagonismo a patógenos**



Fonte: Acervo GDBM

## 4.5 Identificação molecular bacteriana

### 4.5.1 Extração do DNA

O processo de extração de DNA seguiu a metodologia de (MOREIRA et al., 2005). Inicialmente foi realizado o inóculo da cepa bacteriana em 10mL de caldo MRS incubado a 37°C/48 horas. Após o período de incubação, os tubos contendo o inóculo foram centrifugados a 4.000 rpm à temperatura ambiente, por 15 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Adicionou-se cerca de 500µL de água Milli-Q, suspendeu-se novamente o pellet e passou-se para o eppendorf, e acrescentou-se mais 500µL de água Milli-Q. Repetiu-se a centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante.

Adicionou-se 1mL de cloreto de lítio na amostra e incubou-se por uma hora com agitação a 37° C no termo agitador. Transcorrido o tempo, centrifugou-se a 4.000 rpm por 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Posteriormente se adicionou 1mL de água Milli-Q e repetiu-se o processo de centrifugação, desprezando-se o sobrenadante. A amostra foi suspensa novamente com 500µL de Lisozima + TE 10 (tampão de extração), a acrescentou-se mais 500µL de Lisozima + TE10, e incubou-se por uma hora a 37°C sobre agitação, a lisozima tem a função de desintegrar a parede celular bacteriana. Com o término da incubação, centrifugou-se a 4.000 rpm por 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante.

Em seguida, a amostra foi suspensa outra vez com 540µL de TE 10 adicionando-se 60µL de SDS a 10% e 3µL de RNAase, misturando-se por inversão. Inseriu-se 500µL de Clorofane (fenol, clorofórmio e álcool isoamílico) e logo após centrifugou-se a 14.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa para outro microtubo e adicionou-se 500µL de Clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico), repetiu-se o processo de centrifugação. Transferiu-se novamente a fase aquosa para um novo microtubo e inseriu-se 500µL de isopropanol.

Centrifugou-se a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C, lavou-se em 500µL com etanol a 70%, e repetiu-se a centrifugação por 10 minutos. Desprezou-se o etanol e secou-se o microtubo contendo o DNA à temperatura ambiente, após estar seco suspendeu-se novamente em 100 µL de água de injeção e congelou-se.

#### 4.5.2 Amplificação do gene 16S

O processo de amplificação da região espaçadora do 16S ocorreu por meio das seguintes etapas: preparação do *mix*, programação da reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação e sequenciamento.

A preparação do *mix* consiste em introduzir os reagentes necessários para amplificar o DNA em um microtubo para que se atinja o volume final de 50 µl, o *mix* continha 0,5 µM de cada iniciador (primers) PA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e PH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3'), 0,2 mM cada de dNTP, tampão de reação (1X) com 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Cloroeto de magnésio), 1 U/µL Taq DNA polimerase.

A programação utilizada no termociclador para amplificação da sequência do DNA foi: ciclo de desnaturação de 2 minutos a 94° C, seguido por três ciclos de desnaturação de 94 °C por 1 minuto cada um, seguido pelo anelamento à 55°C por 1 minuto, e extensão a 72° C por 1 minuto, os três últimos processos (desnaturação, anelamento e extensão) foram repetidos por 34 vezes e a extensão final durou 10 minutos à 72°C (GUO et al., 2010).

Os produtos da amplificação da região espaçadora do 16S foram separados em gel de agarose a 1%, submetidos a 100 Volts por cerca de 4 horas e 30 minutos através do tampão TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) 0,5 X sendo corados pelo Blue Green. A banda amplificada foi purificada com o PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.5.3 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado *ABI Prism Sequencer 3500* (*Applied Biosystems*, USA) na plataforma de sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. E a identificação dos isolados bacterianos foi realizada com sequenciamento parcial do gene do RNA ribossomal 16S segundo a metodologia de (LUCENA et al., 2010).

Para análise das sequências de DNA, foram selecionadas as sequências que possuem mais de 500 pb (pares de base) usando as ferramentas *Pregap4* e *Gap4* do pacote de *softwares* STADEN 1.6 e em seguida as sequências foram submetidas à busca de similaridade no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), utilizando a ferramenta *Blast N* (ALTSCHUL et al.,1997) e no *Ribosomal Database Project* (RDP). A identificação

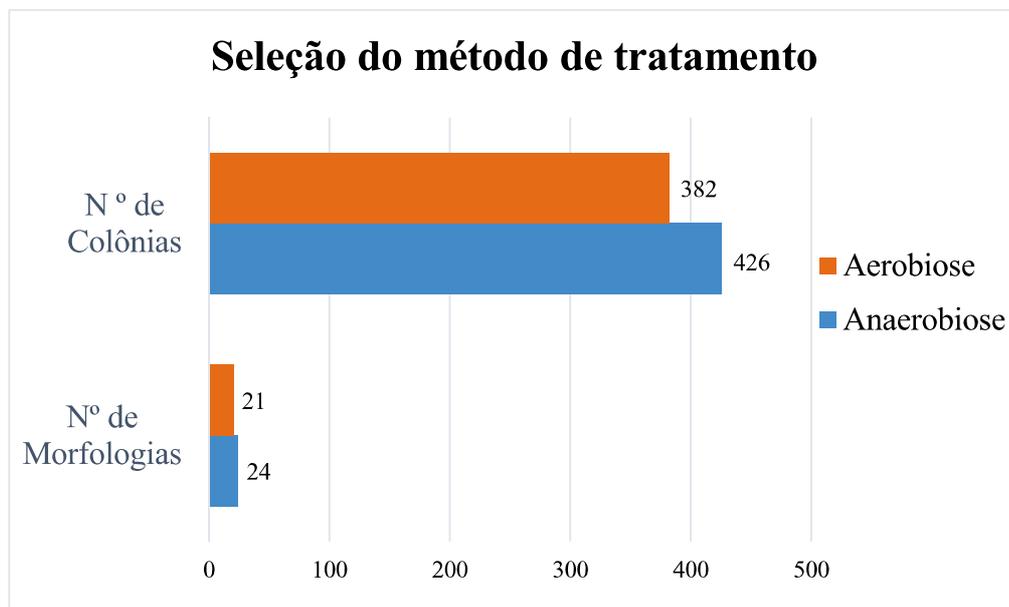
bacteriana foi assumida quando a sequência de consulta mostrou similaridade > 97% para o gene rDNA16S (GEVERS et al., 2005; GUO et al., 2010).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção do método de isolamento

Comparou-se dois tratamentos de isolamento, um em ambiente de anaerobiose e outro em aerobiose, sendo avaliados quanto ao número de isolados e o número de morfologias das quatro parcelas do estudo.

**Figura 8** – Seleção do tratamento para isolamento bacteriano



Fonte: Acervo GDBM

Com base nos dados obtidos, o método escolhido para isolamento foi com enriquecimento de glicose 5% em ambiente de anaerobiose, visto que apresentou maior diversidade de morfologias (24) e no número de isolados (426) em relação ao tratamento em aerobiose. A partir do isolamento criou-se uma coleção de trabalho com 80 isolados, obtida através da distribuição de 20 amostras para cada parcela 1, 5, 7 e 9.

### 5.2 Triagem dos isolados bacterianos

#### 5.2.1 Teste de coloração de Gram e atividade da enzima catalase

O teste de coloração de Gram foi aplicado nos oitenta isolados, fase em que foi avaliada a coloração da parede celular e a morfologia bacteriana. Nesse teste, setenta e quatro isolados eram Gram positivos representando cerca de 92,5% dos isolados e seis isolados (7,5%) foram

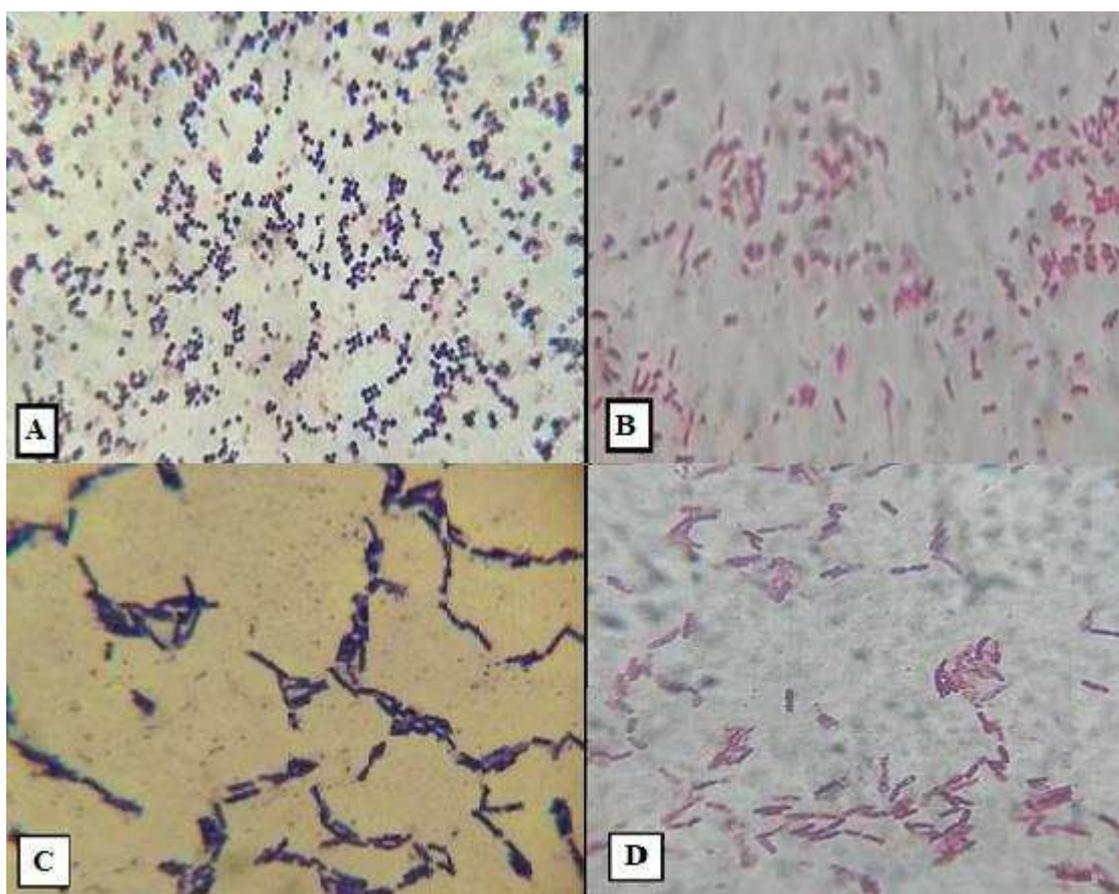
caracterizados como Gram negativos. Em relação ao formato das células bacterianas, os oitenta isolados apresentaram-se em três morfologias: cocos, bacilos e cocobacilos (Tabela 1).

**TABELA 1** – Resultado do teste de coloração de Gram e morfologias bacterianas

Formato	Gram		Total
	Positivo	Negativo	
Cocos	59	1	60
Bacilos	15	3	18
Cocobacilos	0	2	02
Total	74	6	80

Do total, sessenta isolados tiveram formato de cocos (figura 9, A), dezoito de bacilos (figura 9, C e D) e dois de cocobacilos (figura 9, B).

**Figura 9** - Resultado do teste de coloração de Gram



Legenda: A- Cocos Gram positivos; B- Cocobacilos Gram negativos; C - Bacilos Gram positivos; D - Bacilos Gram negativos.

O teste de atividade de catalase tem o intuito de avaliar se a cepa bacteriana tem a capacidade de catalisar a reação de degradação do peróxido de hidrogênio, que é fruto do metabolismo de microrganismo que crescem na presença de oxigênio e produzem substâncias oxidantes tóxicas ao metabolismo com: peróxidos, superóxidos e radical hidroxila. Quando submetidos ao teste quarenta e nove isolados (61,25%) reagiram ao peróxido de hidrogênio, sendo caracterizados como catalase positivos, e trinta e um (38,75%) não reagiram tendo resultado negativo para atividade da enzima catalase (Tabela 2):

**TABELA 2** – Respostas dos isolados aos testes de coloração de Gram e catalase

Amostra	Gram		Catalase	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Parcela 1	16	4	10	10
Parcela 5	18	2	15	5
Parcela 7	20	0	10	10
Parcela 9	20	0	14	6
Total	74	6	49	31

A triagem selecionou trinta e um microrganismos com características comuns as bactérias ácido lácticas, ou seja, apresentaram a parede celular Gram positiva, atividade negativa da enzima catalase, como são anaeróbicas não produzem essa enzima e morfologia de cocos ou bacilos. Sendo escolhidas estas características porque as BAL são um dos principais grupos bacterianos empregados como probióticos.

Estudos que relatam a microbiota de solo em diferentes ecossistemas, como Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Matas Ciliares, refletem uma maior predominância de bactérias Gram positivas e catalase positivas (BACH, 2008; SILVA et al., 2012). No entanto, são escassos os trabalhos de caracterização morfológica e diversidade microbiana em solos da caatinga, Soares Jr. et al. (2012), estudando bactérias celulolíticas em solo da caatinga, observou a presença de Gram positivas, tendo como principais representantes os *Bacillus* e Actinobactérias. Além disso, nosso grupo, em estudos recentes na mesma área de coleta, utilizando o meio de cultura TSB para isolamento, também observou o domínio de bactérias Gram positivas nesta área (NEVES, 2016), corroborando com os presentes dados utilizando o meio MRS.

O meio MRS foi descrito por Rogosa, Mitchell e Wiseman (1951) como um meio seletivo para *Lactobacillus* e já foi utilizado em trabalhos para isolamento de bactérias ácido lácticas em solo de pastagem (VIEIRA et al., 2012) e solos de vinhedos (YANAGIDA; CHEN; SHINOHARA, 2005), assim como para isolamento de *Bacillus* do solo do Himalaia (ISLAM

et al., 2011). Nosso trabalho consiste em um dos primeiros relatos com enfoque na identificação de bactérias do solo da Caatinga e na avaliação do potencial probiótico destes microrganismos.

### 5.3 Avaliação do potencial probiótico

#### 5.3.1 Avaliação de sensibilidade aos diferentes pHs

A capacidade dos microrganismos de tolerarem condições adversas do ambiente gastrointestinal é um fator importante para seleção de microrganismos probióticos, porque para que a cepa possa desempenhar benefícios e funções tem que sobreviver no ambiente no qual está inserida (LEE et al., 1999). Então, o teste de exposição a diferentes valores de pH foi aplicado com vinte e três isolados. Que foram expostos ao pH 7,2 (controle), 3 e 2 por até três horas (Tabela 3):

**TABELA 3** - Avaliação de presença (+) e ausência (-) de multiplicação dos isolados bacterianos quando expostos a pH 2 e pH 3 após 0 e 3 horas

Isolados bacterianos	pH 3		pH 2	
	0 horas	3 horas	0 horas	3 horas
MRS 1.3	+	+	+	-
MRS 1.4	-	-	-	-
MRS 1.7	+	+	-	-
MRS 1.9	+	+	-	-
MRS 1.11	+	+	-	-
MRS 1.12	-	-	-	-
MRS 1.14	+	+	-	-
MRS 1.16	+	+	-	-
MRS 5.13	-	-	-	-
MRS 5.18	-	-	-	-
MRS 7.5	-	-	-	-
MRS 7.7	-	-	-	-
MRS 7.8	+	+	+	+
MRS 7.10	-	-	-	-
MRS 7.15	-	-	-	-
MRS 7.16	+	+	+	-
MRS 7.20	-	-	-	-
MRS 9.1	+	+	+	+
MRS 9.2	-	-	-	-
MRS 9.5	-	-	-	-
MRS 9.6	+	+	+	+
MRS 9.12	-	-	-	-
MRS 9.19	-	-	-	-

Legenda: + = tolerou a exposição ao pH; - = não tolerou a exposição deste pH; □ = boa tolerância; ○ = resistiu ao pH 3; ● = resistiu ao pH 2.

A exposição dos isolados a valores de pH extremos foi realizada com o intuito de avaliar uma possível resistência das cepas à passagem pelo trato gastrointestinal humano, onde microrganismos são expostos a diferentes variações de pH, desde pH neutro na boca, até pH ácido no estômago, fator crítico para que cepas probióticas possam chegar viáveis no intestino humano. A exposição ao pH 7,2 simula o pH da saliva, enquanto a exposição a valores de pH de 2 e 3 simula a ação do ácido clorídrico estomacal.

Um total de treze isolados não resistiram a exposição aos diferentes pHs, demonstrando que as condições ácidas do ambiente gástrico são um importante critério de seleção para um candidato a probiótico, porque normalmente a faixa de pH ideal para o crescimento bacteriano é em torno de 6,5 a 7,5 podendo algumas espécies atingir limites extremos (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012).

Cerca de dez isolados apresentaram boa tolerância aos pHs mais ácidos, cinco isolados apresentaram-se viáveis após a exposição a pH 3,0 por 3 horas, o mesmo número de cepas tolerou ao pH 2,0 porém apenas três mantiveram-se viáveis durante as 3 horas do experimento. Há trabalhos que relatam tolerância variável dos candidatos a probióticos quando submetidos ao pH 3,0 e pH 2,0 (HYRONIMUS et al., 2000; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012). Este fato está associado a capacidade destes microrganismos em tolerar e se proteger das condições adversas do ambiente gastrointestinal e varia consideravelmente se o microrganismo está inserido em uma matriz alimentar ou em uma microcápsula (ZARATE et al., 2000). Sabendo que dez isolados foram capazes de tolerar e mantiveram-se viáveis às condições adversas do ambiente estomacal, os mesmos foram selecionados e submetidos ao teste de antagonismo a patógenos.

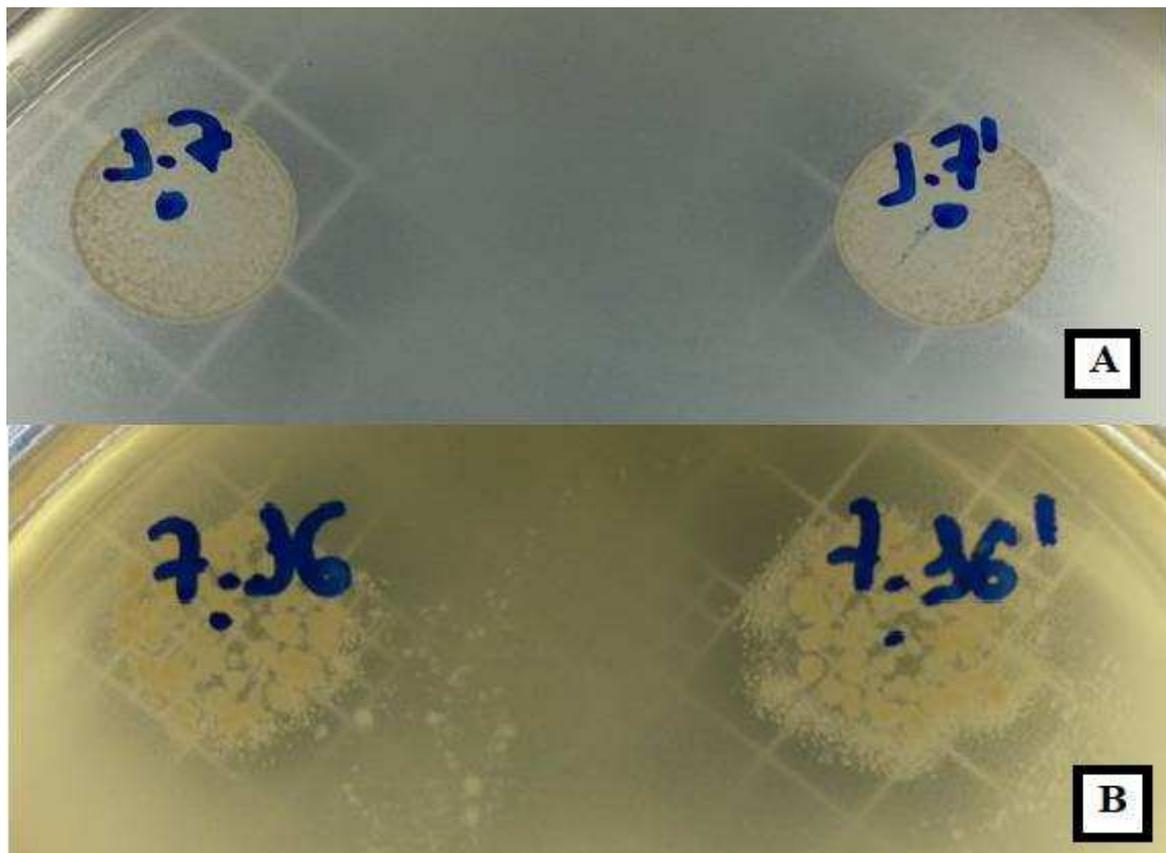
### 5.3.2 Avaliação do antagonismo contra patógenos

Avaliou-se a atividade dos dez isolados tolerantes aos níveis de pH contra cinco patógenos indicadores: *Salmonella typhi* (ST), *Salmonella enteritidis* (SE), *Staphylococcus aureus* (SA), *Listeria monocytogenes* (LM) e *Escherichia coli* patogênica (EC). Resultando na inibição positiva de dois candidatos a probióticos com halos contra o patógeno *Salmonella typhi* (Tabela 4). O isolado MRS 1.7 apresentou halo de inibição médio de 4,5 mm (figura 10, A) e o MRS 7.16 com halo de inibição médio de 3,5 mm (figura 10, B).

**TABELA 4** - Atividade antagonica contra patógenos de veiculação alimentar

Isolados bacterianos	Patógenos				
	ST	SE	SA	LM	EC
MRS 1.3	-	-	-	-	-
MRS 1.7	⊕	-	-	-	-
MRS 1.9	-	-	-	-	-
MRS 1.11	-	-	-	-	-
MRS 1.14	-	-	-	-	-
MRS 1.16	-	-	-	-	-
MRS 7.8	-	-	-	-	-
MRS 7.16	⊕	-	-	-	-
MRS 9.1	-	-	-	-	-
MRS 9.6	-	-	-	-	-

Legenda: ST = *Salmonella typhi*; SE = *Salmonella enteritidis*; SA = *Staphylococcus aureus*; LM = *Listeria monocytogenes*; EC = *Escherichia coli* patogênica. + = atividade antagonica positiva com halo > 1 mm; - = não apresentou atividade antagonica.

**Figura 10** - Halos de inibição contra o patógeno *Salmonella typhi*

Legenda: A- Inibição do isolado MRS 1.7; B - Halo de isolado MRS 7.16

Fonte: Acervo GDBM

Os dois isolados MRS 1.7 e 7.16 que apresentaram atividade antagônica positiva com halo de inibição superior a 1 mm de diâmetro seguiram para identificação molecular. Os microrganismos com atividade antimicrobiana são capazes de inibir patógenos através da competição por nutrientes, impedindo a ligação dos patógenos a mucosa intestinal e também com a produção de substâncias antimicrobianas, bacteriocinas e produção de metabólitos secundários (ARENA et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

As BAL são microrganismos fermentadores que atuam promovendo a acidificação de substratos, através da produção de ácidos orgânicos como ácido lático, acético, propiônico e etanol levando a diminuição do pH que tem ação bactericida inibindo as bactérias deteriorantes e oportunistas como a *Pseudomonas sp.*, patogênicas como a *Salmonella sp.* e *L. monocytogenes* e toxigênicas como *S. aureus* e *Clostridium botulinum* (HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995). Esses microrganismos produzem compostos como o peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e aminas que possuem ação bacteriostática contra microrganismos invasores que disputam os sítios de ligação da mucosa intestinal (FERNANDES; BENTO; STAMFORD, 2008).

As bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelos ribossomos bacterianos, com seus mecanismos de ação relacionados a modificar o gradiente de prótons da membrana citoplasmática, dissipar a força próton-matriz e criar poros na membrana ou na parede celular resultando na lise celular (SCHULZ et al., 2009). Diante de seu papel antimicrobiano as bacteriocinas são importantes na indústria alimentícia, farmacêutica e em aplicações clínicas, porque elas atuam inibindo ou reduzindo a contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos, sendo utilizadas como uma saída para os conservantes químicos e empregadas como bioconservantes mantendo a estabilidade, a segurança e aumentando a vida útil dos alimentos (PERALTA; BERTEL; MONTOYA, 2009).

Do ponto de vista clínico, agem como agentes terapêuticos sendo utilizadas na profilaxia de infecções bacterianas, doenças associadas a patógenos e tem atividade anticancerígena agindo contra células leucêmicas e tumorais (YANG et al., 2014). Também são alternativas para indústria farmacêutica não sintetizar antibióticos cada vez mais potentes contra microrganismos multiresistentes, que são fruto do uso indiscriminado dos mesmos pela população, resultando na resistência desses microrganismos aos principais medicamentos comercializados (BRAZ et al., 2014).

As bactérias do gênero *Bacillus* por sua vez, também produzem bacteriocinas que tem ação antimicrobiana contra patógenos humanos e fitopatógenos (SUBRAMANIAN e SMITH, 2015). Tendo aplicações na indústria alimentícia como bioconservantes aumentando a vida útil

dos alimentos e consiste em uma alternativa para substituir o uso dos conservantes químicos (OLIVEIRA; SIQUEIRA-JR; SILVA, 2012). Agem também como antifúngicos e bioinseticidas de plantas garantindo controle biológico de fitopatógenos, promovendo o crescimento da planta e conseqüentemente uma boa rentabilidade na agricultura (BEZERRA et al., 2013).

São capazes de sintetizar enzimas como as proteases, fitases, xilanases, ciclodextrinases, queratinases e amilases que agem como catalisadores do processamento, melhoramento do sabor e conservação dos alimentos (SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005). As proteases alcalinas são empregadas na indústria de detergentes, também são aplicadas na panificação promovendo a hidrólise parcial do glúten de farinhas, por outro lado as amilases são utilizadas pela indústria de bebidas (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004) e ainda são capazes de controlar a polinização de plantas com uso de ribonucleases (LANNENPAA et al., 2005).

Algumas espécies produzem antibióticos peptídicos que são frutos do metabolismo secundário tendo ação antifúngica e antibacteriana, essas substâncias são peptídeos cíclicos como as gramicidinas, maltacinas, tirocidinas e bacitracinas e também lipopeptídeos como iturinas, bacilomicinas, surfactinas e fengicinas (STEIN et al., 2005). Esta diversidade de aplicações refletem em benefícios para a população e incentivo para continuação de pesquisas visando novas descobertas e aplicações destes microrganismos.

#### 5.4 Identificação molecular

Os isolados com atividade antimicrobiana foram identificados através da análise do sequenciamento parcial do rRNA 16S, onde o MRS 1.7 foi identificado a nível de gênero como um *Bacillus* sp. e o MRS 7.16 como *Bacillus ginsengihumi* apresentado 98,8% de similaridade.

O *Bacillus ginsengihumi* foi descrito a partir do extrato de solo de Ginsegn da Coréia do Sul por (TEN et al., 2006). É uma espécie nova que difere-se dos demais *Bacillus* por não apresentar atividade a enzima catalase que foi um critério de triagem do presente estudo, sobrevive a temperaturas de até 45°C sendo um ponto a favor para sobreviver em ambiente semiárido, são capazes de esporular resistindo a condições adversas, quando descrito foi constatado resiste entre o pH 5 ao 10 neste estudo foi além do esperado resistindo até o pH 2 e quando submetido a patógenos apresentou inibição positiva contra *Salmonella typhi* apresentando características promissoras para um futuro probiótico.

Esta espécie também possui aplicabilidade para indústria, visto que foi caracterizada a produção de fitase por este *Bacillus* (AKHMETOVA et al., 2013). As fitases são enzimas

responsáveis por hidrolisar o fitato, este composto tem a capacidade ligar-se fortemente com cátions como cálcio, magnésio, zinco, cobre, ferro e potássio formando complexo minerais insolúveis, impossibilitando a absorção desses nutrientes pelo organismo (KUMAR et al., 2010). Então, estas enzimas são utilizadas na indústria alimentícia pelo fato delas facilitarem absorção de fósforo, aumentando a disponibilidade de minerais essenciais como cálcio, ferro e zinco para indivíduos monogástricos como os seres humanos, podendo ser aplicada contra a deficiência de mineral desses indivíduos e além de ser uma alternativa para uso de fósforo inorgânico na dieta animal gerando um melhor aproveitamento do mesmo nas rações de aves e suínos (ASCHERI; DE SOUZA; REBELLO, 2012).

Também podem ser aplicadas na agricultura, afim de garantir melhor rendimento e produtividade agrícola em reflexo do aumento da disponibilidade de fósforo no solo proporcionado pelas fitases, além de desenvolver uma agricultura sustentável sem o emprego de agrotóxicos (SHARIPOVA et al., 2015). Diminui a poluição oriunda da excreção do fósforo no solo pelas fezes e urina dos animais e evitam a produção de subprodutos tóxicos e carcinogênicos sejam escoados para os rios e lagos causando assim a eutrofização e impacto ao meio ambiente (SELLE e RAVINDRAN, 2007).

## 6 CONCLUSÃO

Mediante todo o processo investigativo exposto ao longo do trabalho, podemos concluir que a pesquisa não está finalizada em seu âmbito científico, isto implica que, continuaremos a avaliar o potencial antimicrobiano deste microrganismo, analisando o composto antimicrobiano que promoveu a inibição positiva, seja ele um ácido orgânico, uma bacteriocina ou um metabólito secundário. Também pode ser investigada sua produção de fitases, visto que estas enzimas apresentam importância nutricional, aumentando a disponibilidade de fósforo na dieta animal, atenuando deficiências nutrientes essenciais e na fertilização de solos agrícolas. E por ser um microrganismo capaz de resistir a temperaturas de até 45°C, também poderia ser investigada a capacidade dessa cepa em fermentar alimentos para aplicação futura como cultivo iniciador e como futuro probiótico, seja na produção de enzimas ou como suplemento alimentar.

Entretanto, ainda é necessário continuar os ensaios *in vitro* como resistência a sais de bile, suscetibilidade a antibióticos para avaliar a segurança deste microrganismo e futuramente partir para testes *in vivo*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOHSEIN, H. S. et al. Characterization and partial purification of a bacteriocin-like substance produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* H1 isolated from cow manure compost. *Animal science journal*, v. 82, n. 2, p. 340-351, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008. Disponível em:<  
[www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 08 de dez. 2017.

AHMED, F. E. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol*, nº 21, p.491-497, 2003.

AKHMETOVA, A. I. et al. Isolation and characterization of a new bacillary phytase. *Russian of Bioorganic Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 384-389, 2013.

ALEXON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology, In: SALMINEN, S. VON WRIGHT, A (Ed.) *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2<sup>nd</sup> ed, New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1998.

ALEXOPOULOS, C.; KARAGIANNIDIS, A.; KRITAS, S. K.; BOSCO, C.; GEORGOULAKIS, I. E; KYRIAKIS, S. C. Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* v. 48, n. 3, p. 137-145, 2001.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANADÓN, A. et al. Prebiotics and probiotics: an assessment of their safety and health benefits. In: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Elsevier Inc, Academic Press, Oxford, UK, p. 1–23, 2016.

ANTUNES, A. E. C. et al. Probióticos: agentes promotores de saúde. *Nutrire – Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007.

ARAÚJO, L. V. C. Levantamento Fitossociológico da Reserva Particular do Patrimônio Natural da Fazenda Tamanduá, Santa Terezinha - PB: Patos, p. 37, 2000.

ARENA, M. P. et al. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 98, n. 17, p. 7569-7581, 2014.

ARENA, M. P. et al. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in microbiology*, v. 7, 2016.

ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories*, v. 8, n. 1, p. 63, 2009.

ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 282-291, 2013.

ASCHERI, J. L. R.; DE SOUZA, V. F.; REBELLO, F. F. P. Fitase: aspectos gerais e suas principais aplicações. *Acta Tecnológica*, v. 6, n. 2, p. 69-76, 2012.

ASLIM, B.; SAGLAM, N.; BEYATLI, Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, v. 26, n. 1, p. 41-48, 2002.

BACH, E. Seleção de bactérias queratinolíticas provenientes de solos brasileiros. 20f. 2008.

BARTOWSKY, E. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Applied Microbiology*, v. 48, p. 149-156, 2009.

BEZERRA, G. A. et al. Uso de *Bacillus spp.* no controle de fitopatógenos em sementes de soja variedade brs valiosa rr. *Revista Agroecossistemas*, v. 5, n. 1, p. 68-73, 2013.

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_02\\_2002\\_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c)>. Acesso em: 08 dez. 2017.

BRAZ, M. R. S. et al. Substâncias antagonistas produzidas por bactérias isoladas de amostras de solo do Rio Pitimbu/RN contra cepas de *Staphylococcus* spp. *Facider - Revista Científica*, n. 6, 2014.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v.57, n. 4, p. 373, 2007.

CAMPOS, F. G.; HABR-GAMA, A.; PLOPPER, C.; TERRA, R.M.; WAITZBERG, D. L. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais. *Rev. bras. Coloproct*, v. 19, n. 1, p. 11-16, 1999.

CASTILHO, N. P. A.; CUNHA, A. F.; ARAÚJO, M. M. P. E. Qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista in vitro de suas bactérias ácido lácticas. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 31, n. 2, 2013.

CHAVES, A. A. M. Avaliação da suscetibilidade à antibióticos de *Lactobacillus plantarum* isolados de salsicharia tradicional portuguesa. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica/Produção animal). Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2013.

CHEN, Y.S.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in applied microbiology*, v. 40, n. 3, p. 195-200, 2005.

COELHO, J. G. Potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus*. 57f. 2013.

- COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probiotics and immune response. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
- CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*, v. 28, p.214–220, 2011.
- DANTAS, J. I. A. et al. Biossíntese de vitaminas em frutos e hortaliças. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 8, n. 4, p. 22-37, 2012.
- DE ANDRADE, R. L.; SOUTO, J. S.; SOUTO, P. C.; BEZERRA, D. M. Deposição de serrapilheira em área de Caatinga na RPPN “Fazenda Tamanduá”, Santa Terezinha-PB. *Revista Caatinga*, v. 21, n. 2, 2008.
- DEGUCHI, Y.; MORISHITA, T.; MUTAI, M. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 13-19, 1985.
- DUC, L. H.; HONG, H. A.; BARBOSA, T. M.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2161– 2171, 2004.
- EUZÉBY, J. P. 2017. List of bacterial names with standing in nomenclature – Genero *Bacillus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 27 fev. 2017.
- EVIVIE, S. E. et al. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food & Nutrition Research*, v. 61, n. 1, p. 131-134, 2017.
- EWASCHUK, J. B.; DIELEMAN, L. A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 12, n. 37, p. 5941, 2006.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada, v. 30, 2002.

FERNANDES, C. E.; BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.22, n.163, p.16-21, jul/ago. 2008.

FERNANDES, G. R. Aplicações tecnológicas atuais e potenciais no mercado para alimentos probióticos. 36f. 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal Appl Bacteriol*, nº 66: 365-378, 1989.

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Frontiers in microbiology*, v. 7, 2016.

GARCIA, G. R. Caracterização microbiológica e avaliação de uma cepa de *Bacillus subtilis* no desempenho de bezerros da raça holandesa. 2008. 68f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Jaboticabal, 2008.

GERSHANOVICH, V. N. et al. Nitrogen assimilation enzymes in *Bacillus subtilis* mutants with hyperproduction of riboflavin. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya*, n. 3, p. 29-34, 2005.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GU, Q. et al. Enhancing vitamin B 12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *International journal of food microbiology*, v. 206, p. 56-59, 2015.

GUO, X. H.; KIM, J. M.; NAM, H. M.; PARK, S. Y.; KIM, J. M. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, v.16, p. 321–326, 2010.

HASLER, C. M.; BROWN, A. C. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 109, n. 4, p. 735-746, 2009.

HAVENAAR, R.; HUIS, J. H. Probiotics: a general view. In: *The Lactic Acid Bacteria* Volume 1. Springer US, p. 151-170, 1992.

HOA, N.T. et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.66, n.12, p. 5241-5247, 2000.

HOLZAPFEL, W. H.; GEINSEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 24, p. 343-362, 1995.

HONG, H. A. et al. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology*, v. 160, n. 2, p. 134-143, 2009.

HONG, H. A. et al. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of applied microbiology*, v. 105, n. 2, p. 510-520, 2008.

HONG, H. A.; DUCLE, H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 29, p. 813-835, 2005.

HYRONIMUS, B. et al. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, v. 61, n. 2, p. 193-197, 2000.

ISLAM, V. I. H. et al. Isolation and characterization of putative probiotic bacterial strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan soil based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*, v. 3, n. 3-4, p. 175-185, 2011.

JACOBSEN, C. N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p. 4949 - 4956, 1999.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 175-181, 2010.

JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Modern Food Microbiology*. 7 ed. New York: Springer, 2005.

KARILUOTO, S. et al. Production of folate by bacteria isolated from oat bran. *International journal of food microbiology*, v. 143, n. 1, p. 41-47, 2010.

KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, Oxford, v.16, n.1, p.29-36, 1994.

KLEEREBEZEM, M. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 4, p. 1990-1995, 2003.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.101, p.229-241, 2001.

KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiology Aliments Nutrition*, n.4, p.121-135, 1986.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, Guildford, v. 12, n. 2, p. 99-107, 2001.

LANNENPAA, M. et al. Prevention of flower development in birch and other plants using a BpFULL1: BARNASE construct. *Plant cell reports*, v. 24, n. 2, p. 69-78, 2005.

LEBLANC, J. G. et al. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, n. 6, p. 1297-1309, 2011.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, p.211, 1999.

LI, P.; GU, Q. J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ95, a potential probiotic strain producing bacteriocins and B-group vitamin riboflavin. *Journal of biotechnology*, v. 229, p. 1-2, 2016.

LI, P.; ZHOU, Q; GU, Q. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins. *Journal of biotechnology*, v. 234, p. 66-70, 2016.

LOPES, R. et al. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 10, p. 185, 2017.

LOPETUSO, L. R. et al. *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, v. 10, n. 8, p. 943-948, 2016.

LUCENA, B.T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC microbiology*, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

MALKOV, S. V. et al. Antitumor features of *Bacillus oligonitrophilus* KU-1 strain. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 38, n. 2, p. 96-104, 2005.

MARSEGLIA, G. L. et al. Role of forced expiratory flow at 25–75% as an early marker of small airways impairment in subjects with allergic rhinitis. In: *Allergy and asthma proceedings*. OceanSide Publications, Inc, p. 74-78, 2007.

MATSUZAKI, T.; SHIMIZU, Y.; YOKOKURA, T. Augmentation of antimetastatic effect on Lewis lung carcinoma (3LL) in C57BL/6 mice by priming with *Lactobacillus casei*. *Medical Microbiology and Immunology*, New York, v.179, n.3, p.161-168, 1990.

MELLO, H. D. et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, p. 724-730, 2013.

MOHAMMED, Y.; LEE, B.; KANG, Z.; DU, G. Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium*. *Microbial cell factories*, v. 13, n. 1, p. 102, 2014.

MONDOL, M. A. M.; SHIN, H. J.; ISLAM, M. T. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine drugs*, v. 11, n. 8, p. 2846-2872, 2013.

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods*, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.

MORAES, F. P. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. *Revista eletrônica de farmácia*, v. 3, n. 2, 2007.

MORAES-FILHO, J. P.; QUIGLEY, E. M. M. The intestinal microbiota and the role of probiotics in irritable bowel syndrome: a review. *Arquivos de gastroenterologia*, v. 52, n. 4, p. 331-338, 2015.

MOREIRA, J. L. S. et al. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC microbiology*, v. 5, n. 1, p. 15, 2005.

NEVES, A. G. D. Identificação molecular de bactérias edáficas em uma área de preservação no semiárido paraibano. 34 f. 2016.

OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA-JR, J. P.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 7, n. 1, p. 09-15, 2012.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, nº 29: 4-8, 1974.

PERALTA, I. C.; BERTEL, S. G.; MONTOYA, V. S. Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. *Revista Teoría y Praxis Investigativa*, v. 4, n. 2, 2009.

PIMENTEL, T. C. Probióticos a Benefícios à Saúde. *Revista Saúde e Pesquisa*, Maringá, v. 4, n. 1, p. 101-107, jan./ abr. 2011.

PITHVA, S. P. et al. Antigenotoxic and Antimutagenic Activities of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Vc against N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *Nutrition and cancer*, v. 67, n. 7, p. 1142-1150, 2015.

POPPI, L. B. et al. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 113-119, 2008.

PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy Journal*, v. 8, p. 993-1002, 1998.

PRIYODIP, P.; PRAKASH, P.Y.; BALAJI, S. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. *Indian Journal of Microbiology*, p. 1-7, 2017.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una Relación Beneficiosa. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista Cubana de Alimentação e Nutrição*, v. 16, n. 1, p. 63-8, 2002.

- ROBINSON, R. K. Encyclopedia of food microbiology. Academic press, 2<sup>a</sup> ed., vol.1, 2014.  
In: Jenson, I. Bacillus. p. 111 – 117.
- RODRÍGUEZ, J. M. Probióticos: del laboratorio al consumidor. Nutrición Hospitalaria, v. 31, n.1, p. 33-47, 2015.
- ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. Journal of Bacteriology, v. 62, n. 1, p. 132, 1951.
- ROSENBERG, J.; ISCHEBECK, T.; COMMICHAU, F. M. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. Biotechnology advances, v. 35, n. 1, p. 31-40, 2017.
- RUIZ-GARCIA, C. et al. Bacillus axarquiensis sp. nov. and Bacillus malacitensis sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 55, n. 3, p. 1279-1285, 2005.
- SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Current probiotics—safety assured. Microbial. Ecol. Health Disease, v. 10, p. 68–77, 1998.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. Nutrition reviews, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeformers as human probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus. Comprehensive reviews in food science and food safety, v. 2, n. 3, p. 101-110, 2003.
- SANTOS, T.T. et al. Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. LWT- Food Science and Technology, v. 73, p. 259-266, 2016.

SANZ, Y.; COLLADO, M. C.; DALMAU, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*, v. 61, n. 9, p. 476-482, 2003.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004.

SCHULZ, D. et al. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 14, n. 2, 2009.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus spp.* para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição (Araraquara)*, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2005.

SCHWECHHEIMER, S. K.; PARK, E. Y.; REVUELTA, J. L.; BECKER, J.; WITTMANN, C. Biotechnology of riboflavin. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 100, n. 5, p. 2107-2119, 2016.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 135, n. 1, p. 1-41, 2007.

SHARIPOVA, M. et al. An improved gene expression system to generate transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring a *Bacillus ginsengihumi* phytase gene, 2015.

SHEHATA, M. G. et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 61, n. 1, p. 65-75, 2016.

SILVA, A. N. et al. Análise quali-quantitativa de bactérias com atividades enzimáticas celulolíticas e proteolíticas isoladas de solo adicionado de vinhaça. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 12, n. 1, 2012.

SOARES-JR., F. L.; MELO, I. S.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 2195-2203, 2012.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 3, n. 1, p. 16-33, 2008.

STEIN, T.; HEINZMANN, S.; DEUSTERHUS, S.; BORCHERT, S.; ENTIAN, K. D. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spa* IFEG in the subtilin sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *Journal Bacteriol*, n. 187, p. 822–828, 2005.

SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome - from an agriculture perspective. *Frontiers in plant science*, v. 6, 2015.

TAM, N. K.; UYEN, N. Q.; HONG, H. A.; DUC, L.; H.; HOA, T. T.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol*, v. 188, p. 2692-2700, 2006.

TEN, L. N. et al. *Bacillus ginsengihumi* sp. nov., a novel species isolated from soil of a ginseng field in pocheon province, South Korea. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 16, n. 10, p. 1554-1560, 2006.

THIRABUNYANON, M.; THONGWITTAYA, N. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella enteritidis* infection. *Research in veterinary science*, v. 93, n°1, p. 74-81, 2012.

TORO, C. R. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. PhD Theses, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 2005.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. *Microbiologia - 10ª Edição*. Artmed Editora, 2012.

TSUKAMOTO, Y.; KASAI, M.; KAKUDA, H. Construction of a *Bacillus subtilis* (natto) with high productivity of vitamin K<sup>2</sup> (menaquinone-7) by analog resistance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v 65, p. 2007–2015, 2001.

VARALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, 2008.

VASHIST, H.; SHARMA, D.; GUPTA, A. A review on commonly used biochemical test for bacteria, 2013.

VESA, T.; POCHART, P.; MARTEAU, P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 14, n. 6, p. 823-828, 2000.

VIEIRA, L. Q. et al. Uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções e inflamações gastrintestinais, *Rev. méd. Minas Gerais*, v. 17, n. 1/2, p. 45-53, 2007.

VIEIRA, S. et al. Isolamento e identificação de bactérias ácido lácticas de solo e pastagens de fazendas produtoras de queijo minas artesanal. In: *Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: *Congresso Latinoamericano de Microbiologia*, 21, 2012, Santos. *Resumos...* Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2012.

VRESE, M. et al. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.73, n.2, p.421-429, 2001.

VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.*, v.16, p. 1018–1028, 2006.

WEGKAMP, A. et al. Physiological responses to folate overproduction in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial cell factories*, v. 9, n. 1, p. 100, 2010.

WOLLOWSKI, L.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr*, Bethesda, v.73, suppl.2, p.451-455, 2001.

WOO J. Y.; GU, W.; KIM, K. A.; JANG, S. E.; HAN, M. J.; KIM, D. H. *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a D galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe*, v. 27, p. 22–26, 2014.

YAMAGUCHI, P. Japan's nutraceuticals today - Functional foods Japan 2006. Disponível em: <<http://www.newhope.com/supply-news-amp-analysis/japan-s-nutraceuticals-today-functional-foods-japan-2006>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

YANAGIDA, F.; CHEN, Y.; SHINOHARA, T. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from soils in vineyards. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 51, n. 5, p. 313-318, 2005.

YANG, S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, v. 5, 2014.

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, v. 161, n. 2, p. 127-131, 2006.

ZARATE, G.; CHAIA A. P.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Viability of betagalactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J. Food Prot*, v. 63, p. 1214–1221, 2000.

ZHAO, X.; KUIPERS, O. P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC genomics*, v. 17, n. 1, p. 882, 2016.

ZHI, Y. et al. Biocontrol of geosmin-producing *Streptomyces* spp. by two *Bacillus* strains from Chinese liquor. *International journal of food microbiology*, v. 231, p. 1-9, 2016.