

ANÁLISE GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus*  
sp. SMIA-2

**SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
AGOSTO - 2020

ANÁLISE GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus*  
sp. SMIA-2

**SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof<sup>a</sup> Meire Leis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
AGOSTO – 2020

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

B523 Bernardo, Samara Pinto Custódio.

ANÁLISE GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus* sp. SMIA-2 / Samara Pinto Custódio Bernardo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

79 f. : il.

Bibliografia: 65 - 74.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. *Bacillus licheniformis*. 2. Genoma. 3. Potencial antimicrobiano. 4. Bacteriocinas. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ANÁLISE GENÔMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO *Bacillus*  
sp. SMIA-2

**SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 10 de agosto de 2020

Comissão Examinadora:

---

Prof. Marco Antonio Martins (Ph.D., Microbiologia do Solo) - UENF

---

Silvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Eng. e Ciências dos Materiais) - UENF

---

Prof<sup>a</sup> Adriane Nunes de Souza (D.Sc. Ciências) - UNIVERSO

---

Prof<sup>a</sup> Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology) -  
UENF - RJ (Orientador)

***Ao meu filho Danilo, amor maior do que eu, ao meu marido Tarcísio, aos meus pais Alcimar e Eliane e ao meu irmão Raphael (in memoriam).***

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor e graça sobre a minha vida. Obrigada Senhor por me sustentar e realizar meus sonhos. Obrigada por me impulsionar além das minhas forças e me carregar no colo nos momentos de fraqueza;

Ao meu filho Danilo, pela compreensão e apoio. Obrigada meu filho, por entender a mamãe em tantos momentos de ausência e cansaço;

Ao meu marido pelo apoio e confiança. Obrigada pelo ombro amigo e incentivo sempre, parceiro da minha vida inteira, amo você!

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio, amor, cuidado. Obrigada pai pelo zelo e tantas caronas no final de semana. Obrigada mãe pelo apoio incondicional, orações e cuidado com o nosso pequeno grande homem;

A minha cunhada Thaís pelo suporte e incentivo.

A todos os meus familiares e amigos pelos momentos de descontração e alegria que tanto me ajudaram a manter a serenidade para continuar;

A prof<sup>a</sup> Meire Lelis Leal Martins, pela orientação profissional, apoio somado à confiança depositada em mim. Muito obrigada professora;

Aos professores da banca por terem aceitado contribuir com este trabalho;

Ao professor Silvério de Paiva Freitas do Laboratório de Fitotecnia/CCTA;

Ao professor Olney Vieira da Motta do Laboratório de Sanidade Animal/CCTA, por toda assistência oferecida;

As técnicas da UENF Aninha e Val, sempre tão dispostas a ajudar.

A professora Luana Pereira e Erica Cruz, pelo apoio e incentivo no meu

momento mais difícil, meu muito obrigada!

Às companheiras de trabalho do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Erica Cruz, Vanessa Andrade, Larissa Pacheco, Selsiane, Ana Lúcia, Bárbara “Baby”, Lara, Pamela, Andressa, pela companhia, cuidado e amizade. Vocês são mais que amigas, são a minha família LTA. Em especial Erica Cruz, obrigada pelo seu cuidado e suporte em todos os momentos.

Aos companheiros sazonais de Laboratório do IFES - Alegre, Paulo Rafael, obrigada pela amizade e colaboração.

Aos amigos do Canadá, Albert Remus Romero Rosana e Cherry Ibarra Romero, pelo apoio, ensinamentos e amizade. Vocês me ajudaram a amenizar a saudade e embarcaram comigo em uma experiência única e enriquecedora.

A UENF que me permitiu desenvolver esse trabalho e pelo suporte financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente, e que acreditaram em mim para que eu conseguisse conquistar esta vitória. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 <i>Bacillus</i> spp.....	4
2.2 <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 .....	7
2.3 Análise do genoma bacteriano para a identificação e predição de metabólitos secundários.....	9
2.4 Metabólitos secundários produzidos por <i>Bacillus</i> spp.....	11
2.5 Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	13
2.5.1 Bacteriocinas.....	14
2.5.2 Peptídeos não-ribossômicos e Policetídeos .....	17
2.6 Grupo do <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
2.7 <i>Bacillus licheniformis</i> .....	19
3. TRABALHOS .....	23
DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE THERMOPHILIC BACTERIUM <i>BACILLUS licheniformis</i> SMIA-2, AN ANTIMICROBIAL- AND THERMOSTABLE ENZYME-PRODUCING ISOLATE FROM BRAZILIAN SOIL.....	23
FUNCTIONAL GENOMICS CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF A THERMOPHILIC BACTERIUM SMIA-2 .....	29
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classificação dos metabólitos secundários produzidos por <i>Bacillus</i> sp. (Adaptado de Horak et al., 2019) .....	12
Figura 2. Mecanismos de ação dos PAMs (Boparai & Sharma, 2020). .....	14
Figura 3. Taxonomia (timeline) do grupo <i>B. subtilis</i> (Caulier et al., 2019). .....	18
Figura 4. Compostos antimicrobianos produzidos pelo grupo <i>Bacillus subtilis</i> (Adaptado de Caulier et al., 2019). .....	19

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas .....	15
Tabela 2: Compostos antimicrobianos produzidos por <i>Bacillus licheniformis</i> .....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APD	Antimicrobial Peptide Database
BAGEL	Based Bacteriocin Genome Mining Tool
BHI	Brain Heart Infusion
BLIS	Bacteriocin Like Inhibitory Substance
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GRAS	Generally Recognized as Safe
JGI	Joint Genome Institute
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRPS	Peptídeos Sintetase Não-Ribossômicos
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKS	Policetídeos Sintetase
RiPPs	Peptídeos Sintetizados Ribossomicamente e Modificados Pós-Traducionalmente
RNA	Ácido Ribonucleico

## RESUMO

BERNARDO, S. P. C., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, agosto de 2020. Análise Genômica e Potencial Antimicrobiano do *Bacillus* sp. SMIA-2. Orientadora: Profª Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Produtos naturais de fontes microbianas surgem como alternativa ao uso dos antibióticos atuais. O gênero *Bacillus*, por incluir espécies de interesse industrial, biotecnológico e ambiental, além de espécies clinicamente importantes, é alvo de vários estudos sobre sua diversidade genética. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo analisar o genoma e estimar o potencial antimicrobiano da bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada por Nunes e Martins (2001) de solos do município de Campos dos Goytacazes. Inicialmente foi realizado o re-sequenciamento do gene 16S rRNA e posteriormente o seqüenciamento do genoma completo da bactéria, visando a identificação da sua espécie e de possíveis genes relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários. O *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 foi selecionado para avaliar a atividade antimicrobiana de sobrenadantes provenientes de culturas submersas da cepa SMIA-2 contendo meio BHI. Com base na análise da sequência do gene 16S rRNA, o grau de semelhança entre o *Bacillus* SMIA-2 e a espécie relacionada mais próxima, *Bacillus licheniformis* Gibson 46<sup>T</sup>, foi de 100%.

Além disso, a análise do genoma de SMIA-2 mostrou valores médios de identidade nucleotídica (ANI) e de hibridização do DNA-DNA (DDH) que identificaram a cepa SMIA-2 como uma nova espécie da linhagem *licheniformis*. O sequenciamento de extremidades emparelhadas rendeu 46.616.926 leituras. O esboço do genoma é

de 4.292.816 bp em 34 contigs (N50, 317.403 bp), com um teor de GC de 45,85%. A anotação do genoma detectou 4.322 sequências de codificação, 11 genes de rRNA e 79 tRNAs. A anotação RAST alocou esses genes em 734 subsistemas, dos quais os mais abundantes são genes associados a carboidratos (15,6%), seguidos por metabolismo de aminoácidos e derivados (13,8%), e cofatores, vitaminas, grupos protéticos, pigmentos (8,3%). O genoma contém inventários de genes que suportam a produção de enzimas termoestáveis, incluindo 5 genes de amilase, 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteínas e 3 enzimas celulolíticas loci sob um complexo de celulosoma putativo. E um total de 13 grupos de genes para metabólitos secundários biossintéticos putativos para peptídeos não ribossômicos (lichenisina, fengicina e bacilibactina) e bacteriocinas (lichenicidina e peptídeo laço) foram previstos usando antiSMASH v5. A comparação filogenética do genoma completo com cepas mais próximas através do TYGS web server e comparações fenotípicas apoiaram fortemente a colocação da cepa SMIA-2 na espécie *licheniformis*. O mapa cromossômico ilustrou a conservação de características genômicas entre *B. licheniformis* SMIA-2, *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> e *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup>. A análise do genoma do *B. licheniformis* SMIA-2 usando BAGEL 4.0 previu o agrupamento de genes para a biossíntese de lichenicidina, sonorensina e peptídeo laço não identificado. A bactéria mostrou efeito antagônico contra vários microrganismos patogênicos, sendo o *Staphylococcus* spp mais sensível. A formação da zona de inibição de sobrenadantes de culturas do SMIA-2 contendo meio BHI contra *S. aureus* ATCC 12600 começou durante a fase de crescimento exponencial (2 h) do microrganismo e alcançou o máximo na fase estacionária (6 h), sugerindo que as substâncias antimicrobianas encontradas no sobrenadante de culturas de SMIA-2 no meio BHI podem pertencer aos compostos antimicrobianos previstos no genoma. Portanto, pode-se concluir que *Bacillus licheniformis* SMIA-2 é um microrganismo promissor para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos que podem ser utilizados clinicamente.

## ABSTRACT

BERNARDO, S. P. C., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, august 2020. Genetic analysis and antimicrobial potential of *Bacillus* sp. SMIA-2. Advisor: Prof<sup>a</sup> Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Natural products from microbial sources appear as an alternative to the use of current antibiotics. Instead the *Bacillus* genus includes species of industrial, biotechnological and environmental interest, in addition to clinically important species, several studies have been carried out on their genetic diversity. In this context, this work aimed to analyze the genome and estimate the antimicrobial potential of the thermophilic bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2, isolated by Nunes and Martins (2001) from soils in the municipality of Campos dos Goytacazes. Initially, the 16S rRNA gene was re-sequenced and then the complete bacterial genome was sequenced, characterizing the identification of its species and possible genes related to the biosynthesis of secondary metabolites. The antimicrobial potential of SMIA-2 against 22 pathogenic microorganisms was also carried out using the overlay assay. *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 was selected to evaluate antimicrobial activity of supernatants from submerged cultures of the SMIA-2 strain containing BHI medium. Based on analysis of 16S rRNA gene sequence, the degree of similarity between *Bacillus* sp. SMIA-2 and the closest related species, *Bacillus licheniformis* Gibson 46<sup>T</sup> was 100%. In addition, the SMIA-2 genome showed an average nucleotide identity (ANI) and DNA-DNA hybridization (DDH) values that identified the SMIA-2 strain as a new species of the licheniformis lineage. Paired –

end sequencing yielded 46,616,926 readings. The draft genome is 4,292,816 bp in 34 contigs (N<sub>50</sub>, 317,403 bp), with a G+C content of 45.85%. Genome annotation detected 4,322 sequences, 11 rRNA genes and 79 tRNAs. The RAST annotation allocated these genes in 734 subsystems, of which the most abundant are genes associated with carbohydrates (15.6%), followed by metabolism of amino acids and derivatives (13.8%), and cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments (8.3%). The genome contains inventories of genes supporting thermostable enzymes production, including 5 amylase genes, 13 loci for xylose metabolism, 55 loci associated with protein degradation and 3 cellulolytic enzymes loci under a putative cellulosome complex. A total of 13 gene clusters for putative biosynthetic secondary metabolites for non-ribosomal peptides (lichenysin, fengycin and bacillibactin) and bacteriocins (lichenicidin and lasso peptide) were predicted using antiSMASH v5. The phylogenetic comparison of the complete genome with the closest strains through the TYGS web server and phenotypic comparisons strongly supported the placement of the SMIA-2 strain in the *licheniformis* species. Graphical circular map of the chromosome of *B. licheniformis* SMIA-2 genome illustrates conserved genomic characteristic among *B. licheniformis* SMIA-2, *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> and *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup>. BAGEL 4.0 analysis of the *B. licheniformis* SMIA-2 predicted gene clusters for a biosynthesis of lichenicidin, sonorensin and unidentified lasso peptide. The bacterium showed an antagonistic effect against several pathogenic microorganisms, with *Staphylococcus* spp. being more sensitive. The formation of the zone of inhibition of supernatants from cultures of the SMIA-2 strain containing BHI medium against *S. aureus* (ATCC 12600) started during the exponential growth phase (2 h) and reached the maximum in the stationary phase (6 h), suggesting that as antimicrobial substances found in the supernatant of SMIA-2 cultures in BHI medium may belong to the antimicrobial compounds predicted in the genome. Therefore, it can be concluded that *Bacillus licheniformis* SMIA-2 is a promising microorganism for the development of new antimicrobial compounds, which can be used clinically.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos ocasionou o desenvolvimento de microrganismos resistentes e multiresistentes, gerando uma situação preocupante visto que, o aumento da resistência dos microrganismos frente aos antibióticos e a incapacidade de discernir os mecanismos de inibição desses microrganismos tornou-se um assunto de enorme preocupação, requerendo imediata atenção da indústria farmacêutica e instituições acadêmicas.

A resistência antimicrobiana é multifacetada, multidimensional, e é a segunda maior causa de mortes no mundo. Tanto as bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas estão ficando imunes ao arsenal atual de drogas antimicrobianas. A necessidade urgente de obter novos antimicrobianos têm impulsionado a pesquisa por Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) produzidos por bactérias (Boparai e Sharma, 2019).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) com características bioquímicas diversas têm sido identificados em diferentes espécies de microrganismos, plantas e animais vertebrados e invertebrados, os quais demonstram atividade contra patógenos bacterianos incluindo linhagens multirresistentes a antibióticos (Sumi et al., 2015).

Os membros da família Bacillaceae são de grande interesse na indústria médica devido aos vastos peptídeos antimicrobianos que eles produzem como agentes terapêuticos. Por décadas, antibióticos sintéticos e naturais têm sido usados para tratar doenças infecciosas, mas a forte dependência dessas drogas



levou a desvantagens significativas que impulsionam desenvolvimento de uma nova geração de antibióticos (Lajis, 2020).

O gênero *Bacillus* é amplamente distribuído no solo e sua versatilidade metabólica permite a síntese de uma ampla variedade de compostos bioativos estruturalmente complexos, a exemplo dos antimicrobianos. Espécies deste gênero são consideradas boas produtoras de substâncias antimicrobianas incluindo antibióticos peptídicos, lipopeptídeos e bacteriocinas. A produção de substâncias antimicrobianas e a capacidade de esporulação conferem aos *Bacillus* sp. dupla vantagem de sobrevivência em diferentes habitats (Abriouel et al., 2011).

*Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, que foi isolada de solos do município de Campos dos Goytacazes, RJ, inserida no grupo de organismos reconhecidos como seguros (GRAS), revelou-se como uma espécie capaz de produzir níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas termoestáveis, tais como: amilases, pectinases, xilanases, celulasas e especialmente as proteases (Souza e Martins, 2001; Silva et al. 2007; Carvalho et al. 2008<sup>a,b</sup>; Andrade et al. 2011; Oliveira et al. 2014; Ladeira et al., 2010; Ladeira et al., 2013, Barbosa et al., 2014; Ladeira et al. 2015; Costa et al. 2017; Cruz et al., 2019), quando cultivada em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial. Porém, apesar de muitos estudos realizados sobre a produção de enzimas, nenhum estudo foi realizado até o momento, sobre a produção de substâncias antimicrobianas pelo *Bacillus* sp. SMIA-2.

O aumento da disponibilidade de genomas microbianos sequenciados e o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática viabilizaram a identificação de genes ou vias biossintéticas associadas com a produção de peptídeos antimicrobianos em diferentes organismos e ecossistemas e a predição de sequências de peptídeos com potencial atividade antimicrobiana (Oliveira, 2017).

Neste, sentido, o sequenciamento genético é uma técnica que possibilita revelar as sequências de bases nucleicas, permitindo assim, desenvolver estudos estruturais e funcionais do genoma, buscando compreender a complexa maquinaria biológica (Ribeiro et al., 2012 ).

*Bacillus* spp. Compreende um grupo heterogêneo composto por organismos diversos que podem ser divididos em nove grupos (grupos I-IX), com

base em seu alto nível características filogenéticas ou fenotípicas ligadas a similaridade da sequência do gene 16S rRNA (Bhandari et al., 2013; Kaya-Ongoto et al., 2019). No entanto, além de sua heterogeneidade, às vezes o gênero *Bacillus* é filogeneticamente incoerente, o que pode levar a uma classificação incorreta de espécies no gênero, um problema que resulta na redefinição repetida do gênero e na reorganização de suas espécies constituintes (Logan e de Vos, 2009; Kaya-Ongoto et al., 2019 ). A sequência do gene 16S rRNA foi inicialmente selecionada em estudos filogenéticos, mas agora é reconhecido que falta poder discriminatório suficiente para diferenciar espécies em muitos gêneros, e com isso o conhecimento de toda a sequência do genoma de cepas bacterianas e a análise das mesmas, são de grande para classificação bacteriana e identificação (Lalucat et al., 2020).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever o sequenciamento do genoma do *Bacillus* sp. SMIA-2, e adicionalmente, estimar seu potencial para produzir compostos com propriedades antimicrobianas desejáveis.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus*, pertencem à família Bacillaceae e é provavelmente o gênero mais antigo e mais diverso entre bactérias (Contesini et al. 2017). É extremamente heterogêneo, tanto geneticamente quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc). É composto, por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas; gram-positivas que formam endósporos resistentes a condições ambientais adversas, tais como calor e dessecação. Muitas espécies de *Bacillus* são móveis por meio de flagelos (Madigan et al., 2010; Gomes, 2013).

As células são em forma de bastonete, retas ou ligeiramente curvas, ocorrendo isoladamente e em pares, alguns em cadeias e, ocasionalmente, em filamentos longos. As colônias possuem tamanho muito variável entre e dentro das espécies. Uma grande diversidade de habilidades fisiológicas é exibida, variando de psicrófilico para termófilico e acidófilico para alcalifílico; algumas cepas são tolerantes ao sal e outras são halofílicas. A maioria das espécies tem pouco ou nenhum potencial patogênico e raramente são associados a doenças em humanos ou outros animais com exceções como *Bacillus anthracis* (antrax), *Bacillus cereus* (alimentos intoxicação e infecções oportunistas) e *Bacillus thuringiensis* (patogênico para invertebrados) (Logan e de Vos, 2009).

As espécies do gênero *Bacillus* quando expostas a condições não favoráveis, como calor, dessecação e falta de nutrientes, formam esporos que podem aumentar a sua sobrevivência e conseqüentemente aumentar a sua resistência no meio ambiente (Polanca, 2019). Podem ser classificadas em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio em: grupo 1 (formado por bacilos Gram-positivos que apresentam esporo central ou terminal; esféricos ou ovóides; não deformam a célula; grupo 2 (constituído de espécies Gram-variáveis; apresenta esporo oval, central ou terminal que deformam a parede celular); e grupo 3 (caracterizado por bacilos Gram-variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal que deformam a parede celular) (Gomes, 2013).

Os membros do gênero *Bacillus* são geralmente encontrados no solo e apresentam ampla habilidades fisiológicas, permitindo que o organismo cresça em todos os ambientes e dispute com outros organismos devido à sua capacidade de formar esporos extremamente resistentes e produzir metabólitos com efeitos antagônicos para outros microrganismos (Amin et al., 2015).

O gênero *Bacillus* foi relatado pela primeira vez por Cohn em 1872, que o descreveu como resistente ao calor e bactérias produtoras de endosporos. Atualmente, o gênero inclui mais de 543 espécies, que apresentam alto percentual de similaridade genética, sendo estreitamente relacionadas. Os grupos de maior representatividade são o do *Bacillus cereus* e o grupo do *Bacillus subtilis* por sua importância médica, biotecnológica e industrial (Logan e de Vos, 2009; Villarreal-Delgado et al., 2018; LPSN, 2020).

Em sua maioria são mesófilos, com temperatura ótima entre 30 e 45°C. Porém o gênero contém um número de termofílicos representativos, que crescem a temperaturas de 65°C ou mais altas. São capazes também de crescerem sob condições extremas de pH e, por isso, originam produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Madigan et al., 2010).

As espécies de *Bacillus* são industrialmente importantes por vários motivos, dos quais se destacam: o seu excelente histórico de segurança por ser reconhecido como um organismo seguro GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (com exceção do *B. cereus* e *B. anthracis*); sua rápida taxa de crescimento que resulta em ciclos curtos de fermentação; e sua alta

capacidade de secreção de proteínas no meio extracelular (Marco, 2012; Sumi et al., 2015), além disso a maioria das enzimas industriais microbianas são provenientes de espécies de *Bacillus* (Outtrup & Jørgensen, 2008). Segundo Monteiro e Silva (2009), a produção industrial de enzimas se destaca devido ao desenvolvimento de novas tecnologias e novos campos de aplicação. A maioria das bactérias do gênero *Bacillus* tem a capacidade de desintegrar proteínas, nomeadamente de atividade proteolítica (Pushpendra et al., 2018).

Além da capacidade de certos *Bacillus sp.* em produzir enzimas e aumentar a utilização de nutrientes de diferentes alimentos, esporos de várias cepas de *Bacillus sp.* também foram incluídos em dietas de aves para controlar a incidência de diferentes doenças gastrointestinais por meio da produção de compostos antimicrobianos ou como agentes de exclusão competitivos contra *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* (Latorre et al., 2016). Segundo Monteiro (2002), a produção de esporos ocorre ao término da fase exponencial, na qual a exaustão de nutrientes, nas espécies de *Bacillus* leva a uma série de processos que afetam sua sobrevivência em condições ambientais adversas. Esses processos incluem: indução de quimiotaxia e motilidade, síntese de enzimas degradativas, desenvolvimento de competência genética, produção de antibióticos peptídicos e, por fim, esporulação.

No esforço para superar a crescente ameaça de doenças infecciosas bacterianas para os seres humanos, produtos naturais de fontes microbianas surgem como a alternativa mais favorável aos antibióticos atuais (Sumi et al., 2015).

Amin e colaboradores (2015) identificaram cepas de *Bacillus sp.* isoladas de amostras do solo de diferentes regiões do rio Bahmanshir, na cidade de Abadan, no Irã, com atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Moshafi et al. (2011) isolaram *Bacillus sp.* do solo capazes de inibir o crescimento das estirpes bacterianas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, além das fúngicas *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus Níger*. O que vai ao

encontro do trabalho de Eldeen (2014), em que as espécies de *Bacillus* foram as que se sobressaíram quanto à atividade antibacteriana de amplo espectro contra as cepas teste.

Carrim et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas, dentre as quais algumas do gênero *Bacillus* (*B. circulans*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* e *B. megaterium*) isoladas de *Jacarranda decurrens* Cham. (carobinha-do-campo) contra diferentes cepas indicadoras. Segundo esses autores, 70% das bactérias apresentaram atividade antimicrobiana, evidenciada pela formação de halos de inibição em placas de ágar com dupla camada contra no mínimo uma ou mais das 15 cepas bacterianas indicadoras testadas.

Latorre et al. (2016) concluíram que *Bacillus* spp. diferem em sua capacidade de produzir enzimas, compostos antimicrobianos, e biofilmes, mesmo que sejam da mesma espécie. Linhagens de *Bacillus* sp. selecionadas como superiores produtores de enzimas foram diferentes dos isolados mostrando uma maior atividade antimicrobiana; no entanto, todos os *Bacillus* sp. isolados no estudo apresentaram determinada atividade de inibição à patógenos.

De acordo com Sumi et al. (2015), peptídeos derivados de bactérias do gênero *Bacillus* mostraram atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antitumorais, anti-amebocíticas, e atividades anti-micoplásmicas. Vários antibióticos peptídicos que são de importância farmacêutica, tais como bacitracina, gramicidina, tirocidina, subtilina, e bacilisina, são produzidos por espécies de *Bacillus*.

## 2.2 *Bacillus* sp. SMIA-2

A bactéria *Bacillus* sp. SMIA-2 foi isolada de amostras de solos coletadas no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil por Souza e Martins (2001). Os resultados da comparação de sequências de 16S rRNA indicaram que o isolado apresentou similaridade com as sequências de *Bacillus caldoxylolyticus* e *Bacillus* sp. AK1 e estes três organismos exibiram níveis de homologia de 94% nas sequências de DNA ribossomal (Souza e Martins, 2001).

De acordo com Souza e Martins (2001), as colônias do microrganismo apresentaram bordas regulares e formas circulares, lisas, brilhantes e com elevação convexa e consistência cremosa após 24 horas de crescimento em ágar nutriente a 50°C. As células do microrganismo isolado apresentaram-se como bastonetes regulares, isolados e em cadeias; identificadas como gram-positivas com esporos presentes com localização terminais e subterminais. Na forma vegetativa, apresentaram 1,2 µm de largura e 5,3 µm de comprimento de dimensão. O crescimento ocorreu em ampla faixa de pH variando de 6,5 a 9,0 e com crescimento ótimo em torno de pH 6,8. A temperatura ótima de crescimento foi em torno de 55°C e a máxima de 70°C. Foi observado que o extrato de levedura, como fonte de nitrogênio, estimulou o crescimento do organismo em meio de cultura com a glicose como fonte de carbono. Com relação ao requerimento do oxigênio, o microrganismo foi classificado como aeróbico.

*Bacillus* sp. SMIA-2 produz níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas termoestáveis, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Ladeira et al., 2013, Barbosa et al., 2014), amilases (Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b), pectinases (Cordeiro et al., 2009; Andrade et al., 2011), xilanases (Cordeiro et al., 2011) e celulases (Ladeira et al., 2015; Costa et al. 2017; Cruz et al., 2019), quando cultivada em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais tais como soro de leite, bagaço de cana, farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial utilizando substratos de baixo custo.

Os estudos sobre a produção de amilases e proteases pela bactéria termofílica *Bacillus* sp. SMIA-2 resultaram no desenvolvimento de um meio de cultura constituído de substratos de baixo custo, que proporcionou a obtenção de excelentes níveis de atividade das enzimas em um único processo fermentativo (Corrêa et al., 2011). Convencionalmente, múltiplas enzimas são produzidas por culturas mistas compostas por diferentes microrganismos ou pela mistura de várias enzimas diretamente através de microrganismos geneticamente modificados dotados de múltiplas funções. No entanto, a produção concomitante destas enzimas em um único processo fermentativo

utilizando apenas um microrganismo é de grande importância para aumentar a eficiência e economia do processo.

Estudos sobre a produção de celulases por *Bacillus* sp. SMIA-2 também foram realizados. Diferentes fontes de celulose, tanto puras (avicel, carboximetilcelulose e celulose microcristalina) quanto naturais complexas de celulose, como o bagaço de cana foram utilizadas no meio de cultura. Entretanto, os níveis de atividade que foram alcançados, quando comparados com os obtidos por diversos autores, foram inferiores aos obtidos usando o *Bacillus* sp. SMIA-2 (Ladeira et al., 2015).

Como descrito anteriormente, SMIA-2 é um excelente produtor de enzimas com a utilização de substratos de baixo custo, contudo seu potencial como agente antimicrobiano precisa ser explorado.

### 2.3 Análise do genoma bacteriano para a identificação e predição de metabólitos secundários

A introdução da genômica está mudando profundamente a taxonomia bacteriana atual. O conhecimento de toda a sequência do genoma de cepas bacterianas e as análises dos genes ganhou valor superior sobre as características fenotípicas para classificação bacteriana e identificação. As comparações digitais do genoma inteiro usando identidades médias de nucleotídeos (ANIs) ou cálculos de distância genoma-a-genoma (GGDCs) são os novos padrões de ouro para circunscrição de espécies. Além disso, as relações filogenéticas entre as bactérias podem ser inferidas a partir das sequências de nucleotídeos de genes selecionados e permitem uma classificação natural de bactérias com base em suas relações evolutivas. A sequência do gene 16S rRNA foi inicialmente selecionada em estudos filogenéticos, mas atualmente é reconhecido que falta poder discriminatório suficiente para diferenciar espécies em muitos gêneros (Lalucat et al., 2020).

Segundo Ribeiro et al. (2012), a técnica de sequenciamento permite revelar as sequências de bases nucleicas e assim desenvolver estudos estruturais e funcionais do genoma. Com a obtenção do genoma, novas análises são necessárias para melhorar o conhecimento biológico dos



organismos, tal como comparação entre genomas de gênero ou linhagens da mesma espécie ou diferentes.

O programa CG Viewer (Circular Genome View), permite a elaboração de mapas gráficos circulares do genoma que são amplamente usados para avaliar as características do genoma e as características da sequência que podem transmitir com eficácia informações que podem ajudar na compreensão das propriedades biológicas e da história evolutiva de organismos (Stothard et al., 2019).

Metabólitos secundários derivados de bactérias, fungos, organismos marinhos e as plantas constituem uma importante fonte de antibióticos, agentes anticâncer, inseticidas, imunossupressores e herbicidas. Muitos metabólitos especializados em bactérias e fungos são biossintetizados por vias metabólicas cujas enzimas são codificadas por *clusters* de genes em um cromossomo. *Clusters* gênicos metabólicos compreendem um grupo de genes fisicamente co-localizados que, juntos, codificam enzimas para a biossíntese de um metabólito específico. A descoberta de novas vias metabólicas está sendo habilitado pela crescente disponibilidade de alta qualidade de sequenciamento do genoma juntamente com o desenvolvimento de *kits* de ferramentas de bioinformática para identificar *clusters* de genes responsáveis pela biossíntese de metabólicos secundários (Chavali e Rhee, 2018).

A variedade de ferramentas que possibilitam a análise de uma grande quantidade de dados faz da bioinformática uma importante aliada na descoberta de novos peptídeos antimicrobianos produzidos por diferentes grupos de bactérias (Flaherty et al., 2014).

Com a bioinformática, análises comparativas são realizadas com o objetivo de analisar e selecionar possíveis alvos de estudos *in vivo* e *in vitro*. Aguiar (2015) ressalta que antes de estudos *in vivo* ou *in vitro*, as análises *in silico* são realizadas.

São diversos os bancos de dados de sequenciamento disponíveis tais como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) e o Joint Genome Institute (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/>). De acordo com Wilkinson e Micklefield (2007), esses dados podem ser utilizados para mineração de regiões conservadas e

predição de proteínas de interesse, sendo possível inferir funções e estruturas, bem como estimar relações filogenéticas entre proteínas e genes de interesse.

A identificação, caracterização e classificação de peptídeos antimicrobianos são auxiliadas por outras ferramentas *online* como algoritmo antiSMASH e o Antimicrobial Peptide Database (APD), utilizadas para análise de sequências de peptídeos antimicrobianos e/ou de metabólitos secundários em genomas microbianos (Velásquez e Van der Donk, 2011; Medema et al., 2011).

Algoritmos destinados especificamente à mineração de genes de bacteriocinas têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas nos últimos anos. Por exemplo, o software BAGEL 4 permite identificar e visualizar agrupamentos de genes no DNA procariótico envolvido na biossíntese de peptídeos ribossômicos sintetizados e pós-translacionalmente modificados (RiPPs) e bacteriocinas (não modificadas) (van Heel et al., 2018).

Portanto o sequenciamento dos genomas e posterior análises de grupamentos de genes metabólicos com o suporte das ferramentas da bioinformática, tornam possível a descoberta, classificação e previsão de novos peptídeos antimicrobianos (Wang et al., 2016; Chavali e Rhee, 2018).

#### 2.4 Metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* spp.

Metabólitos secundários são importantes moléculas bioativas produzidas por espécies de *Bacillus*, que têm sido estudadas devido as suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e bactericida (Moshafi et al., 2011; Alvarez-Ordóñez et al. 2014; Horak et al., 2019). Essas moléculas são principalmente peptídeos antimicrobianos (PAMs), que são caracterizadas por estruturas geralmente cíclicas, hidrofóbicas e contêm porções peculiares, como D-aminoácidos (AA) ou ligações tioéter intramoleculares. Além de PAMs, metabólitos voláteis também constituem uma grande família de antimicrobianos exibindo vários papéis metabólicos e funcionais (Caulier et al., 2019).

Ruiz et al. (2010) afirmam que metabólitos secundários são pequenas moléculas orgânicas que normalmente não são essenciais para o crescimento

e desenvolvimento do organismo produtor, mas que contribuem para a sua adaptação ao longo de sua evolução. São produtos naturais muito diversificados, com uma gama de atividades biológicas e propriedades farmacológicas. Possuem estruturas incomuns e geralmente são formados durante a fase final de crescimento dos microrganismos produtores, na qual a sua síntese pode ser grandemente influenciada pela manipulação do tipo e concentração dos nutrientes que formulam os meios de cultura.

Os metabólitos secundários microbianos têm sido uma fonte importante de antibióticos clinicamente úteis. Sabe-se que as espécies de *Bacillus* são uma das maiores fontes de produtos naturais bioativos, que exibem ampla atividade antibiótica e são produzidas como polipeptídeos de baixo peso molecular, por mecanismos ribossômicos ou não ribossômicos (Figura 1) (Stoica et al., 2019).

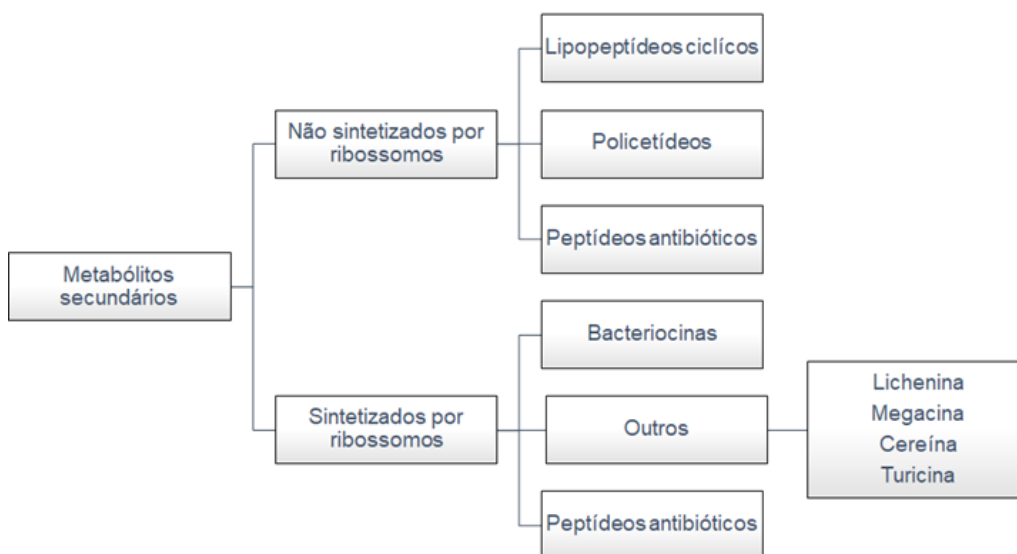


Figura 1 Classificação dos metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* sp. (Adaptado de Horak et al., 2019)

Os metabólitos secundários não sintetizados por ribossomos são peptídeos sintetizados por sintetases, que, ao contrário dos ribossomos, são independentes do RNA mensageiro, sendo conhecidos como peptídeos não-ribossômicos (NRPS). Similarmente aos peptídeos não-ribossomais, devido ao mecanismo versátil de montagem, os policetídeos, produzidos por

policetídeos sintetase (PKS), exibem notável diversidade tanto em termos de estrutura quanto em atividade biológica. Além de peptídeos não-ribossomais e de policetídeos, diversos *Bacillus* sp. também podem produzir interessantes peptídeos antimicrobianos sintetizados pelos ribossomos como as bacteriocinas e peptídeos sintetizados por ribossomos e modificados pós-traducionalmente (RiPPs) (Stoica et al., 2019).

## 2.5 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas constituintes da imunidade inata de organismos multicelulares, podendo ser expressos de forma constitutiva ou induzida. Essas moléculas apresentam variedade quanto a sequência, estrutura e conformação, geralmente possuindo de 12 a 50 aminoácidos (Pinheiro da Silva e Machado, 2012; Roscia et al., 2013). Uma característica comum entre esses peptídeos é a presença de resíduos de cisteínas em número par (4, 6 ou 8), interconectadas por pontes dissulfeto, conferindo a eles uma alta estabilidade (Hegedus e Marx, 2013; Roscia et al., 2013). Além disso, devido a sua anfipaticidade, carga catiônica e tamanho, esses peptídeos possuem a habilidade de se inserirem facilmente nas membranas lipídicas, e uma vez dentro da célula bacteriana o peptídeo então exercerá seu efeito no DNA ou RNA (Bahar e Ren, 2013).

De acordo com a via biossintética os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados em duas classes diferentes: a primeira classe compreende peptídeos sintetizados por vias ribossômicas, incluindo bacteriocinas, enquanto a segunda classe compreende pequenos peptídeos microbianos sintetizados enzimaticamente por vias não ribossômicas (Baruzzi et al., 2011).

Uma das hipóteses sobre o mecanismo de ação (Figura 2) dessas moléculas envolve a habilidade dos PAMs causarem um colapso na membrana devido a formação de poros, através da interação com os lipídios da superfície celular dos microrganismos. Esses poros tornam a célula mais permeável, levando-a a morte. Os peptídeos também podem penetrar na membrana celular, sem formar poros, alcançam o ambiente citosólico e interferem na síntese de biomoléculas importantes para a sobrevivência do microrganismo, resultando em vazamento de íons e metabólitos,

despolarização da membrana e interrupção do processo de respiração, síntese de biopolímeros e morte celular (Sumi et al., 2015).

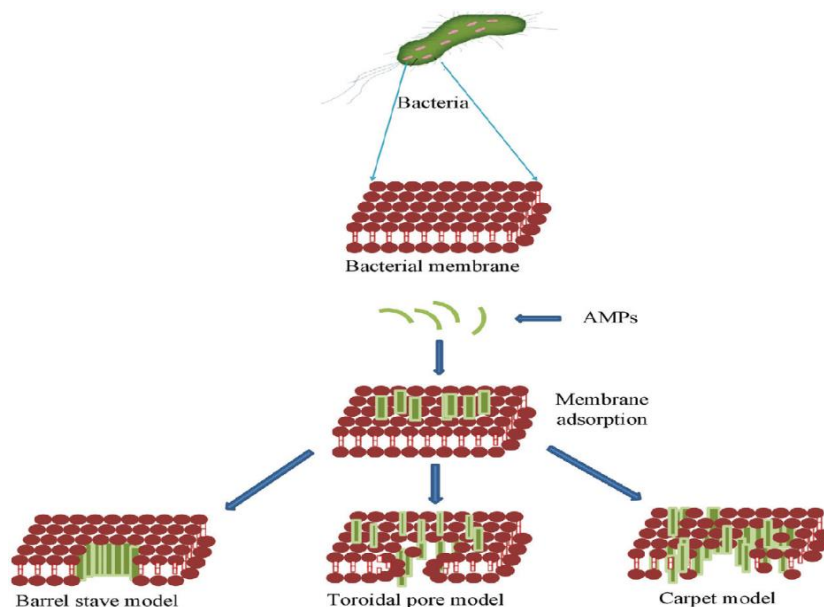


Figura 2. Mecanismos de ação dos PAMs (Boparai & Sharma, 2020).

Diferentes PAMs têm apresentado um amplo espectro de ação, sendo efetivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários, envelopes virais e recentemente, têm sido estudados como possíveis moléculas de combate às células tumorais. Isto faz dos PAMs uma alternativa ao uso de antibióticos convencionais, especialmente no tratamento de infecções geradas por microrganismos resistentes a antibióticos já usados (Baron et al., 2018).

Além do mais, Barros et al. (2020) ressaltam o potencial dos PAMs serem utilizados como ativos em alimentos, visando ampliar o tempo de prateleira e a segurança dos alimentos, além de permitirem que novos produtos com melhor qualidade e propriedades nutricionais sejam introduzidos no mercado.

### 2.5.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados por ribossomos, caracterizadas como moléculas de baixo peso molecular que exibem atividades de inibição do crescimento contra bactérias próximas à cepa produtora da bacteriocina (Caulier et al., 2019). As bacteriocinas podem ser divididas em três classes (tabela 1) segundo a sua estrutura primária, estabilidade térmica, peso molecular e mecanismo de ação.

Tabela 1. Classificação de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas

Classes	Designação
Classe I ( ≤ 5 KDa) - Modificadas (sofrem modificações pós-traducionais)	Lantipeptídeos Tiopeptídeos Sactipeptídeos Peptídeos laço
Classe II (4 a 6 KDa) - Não modificadas ou cíclicas Subclasses IIa, IIb, IIc, IId, IIe	tipo pediocina; com dois peptídeos; cíclicas; tipo não-pediocina, linear
Classe III (10 kDa) – grandes e termolábeis	Bacteriolisinas

Fonte: Adptado de Cotter et al. 2013; Acedo et al., 2018.

Segundo Cotter et al. (2013), algumas bacteriocinas e, em particular, muitas que inibem bactérias Gram-positivas, atuam visando o envelope celular. Algumas bacteriocinas de classe I inibem o lipídio II na membrana celular, revogando assim a síntese de peptidoglicano. Outras bacteriocinas formam poros para inibir ou matar sua bactéria alvo. Por exemplo, bacteriocinas da classe II, como a Lactocina A, se ligam ao receptor manose de formação de poros do sistema fosfotransferase (Man-PTS). Outros peptídeos de classe I, como os tiopeptídeos e botromicinas, controlam as bactérias Gram-positivas direcionando a tradução. Já as bacteriocinas da

classe III tem o seu mecanismo de ação diferenciado das demais bacteriocinas, promovendo a morte celular através da lise da parede celular do microrganismo alvo (Chang et al., 2009).

A maioria das bacteriocinas de bactérias Gram-positivas eram tradicionalmente divididas em duas classes principais, a saber, lantibióticos, que são bacteriocinas pós-traducionais e bacteriocinas não modificadas. Na última década ocorreu o aumento de produtos de peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs) em bactérias Gram-positivas que possuem atividade antibacteriana (Acedo et al., 2018).

Os lantipeptídeos são produtos naturais, bacteriocinas, que fazem parte do grupo de peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs). O termo "lantipeptídeo" abrange tanto lantibióticos quanto compostos semelhantes que não são antimicrobianos (Acedo et al., 2018; Habibi et al., 2019). Muitas bacteriocinas de *Bacillus* sp. pertencem aos lantibióticos, uma categoria de peptídeos pós-traducionais modificados amplamente disseminados entre diferentes clados bacterianos. Lantibióticos são bacteriocinas definidas pela presença dos anéis Lan e / ou Melan (Acedo et al., 2018). Os lantibióticos estão entre os peptídeos antimicrobianos mais bem caracterizados nos níveis de estrutura peptídica, determinantes genéticos e mecanismos de biossíntese (Abriouel et al., 2011). Alvarez-Ordóñez et al. (2014) isolaram cepas de *Bacillus licheniformis* de fórmulas de leite infantil capazes de produzir o lantibiótico lichenicidina que demonstrou atividade antibacteriana contra diversas bactérias gram-positivas.

Peptídeos laço também fazem parte do grupo de peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs). São uma classe de produtos naturais sintetizados por várias bactérias e como o nome indica, esses peptídeos adotam uma topologia semelhante a um laço rosqueado ou um nó (Maksimov et al., 2012). Essas características fazem esses peptídeos ótimos candidatos para a produção de compostos bioativos mais potentes e mais seletivos (Martin-Gómez & Tulla-Puche, 2018). De acordo com Anirson et al. (2013), os peptídeos laço são notavelmente resistentes a proteases e agentes desnaturantes, e esta alta estabilidade além de suas atividades biológicas têm intensificado o interesse por esses peptídeos.

Outras substâncias antimicrobianas que não foram bem caracterizadas são conhecidas como substâncias inibidoras do tipo bacteriocina (BLIS). Este termo é frequentemente usado quando a natureza do peptídeo do composto antimicrobiano não foi confirmada (Abriouel et al., 2011). Guo et al. (2012) verificaram que a cepa *Bacillus licheniformis* B116 isolada do solo, produz substâncias inibidoras do tipo bacteriocina (BLIS) com ação antimicrobiana contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.

Segundo Acedo et al. (2018), as bacteriocinas além de serem consideradas possíveis alternativas aos antibióticos também podem ser usadas na preservação de alimentos e no biocontrole de fitopatógenos.

### 2.5.2 Peptídeos não-ribossômicos e Policetídeos

Os peptídeos não ribossômicos e os policetídeos abrangem uma variedade de mecanismos lineares, cíclicos e estruturas ramificadas, geradas por complexos enzimáticos conhecidas como peptídeos sintetases não ribossômicos (NRPS) e policetídeos sintetases (PKS) (Zhao et al., 2016).

Diversas espécies de *Bacillus* produzem uma ampla gama de peptídeos sintetizados por NRPS. Esses peptídeos têm uma variedade de formas e funções, incluindo sideróforos quelantes de ferro, biosurfactantes, lipopeptídeos cíclicos citotóxicos e peptídeos clinicamente importantes antibióticos. Além disso, várias cepas de *Bacillus* com atividades antibacterianas e /ou antifúngicas são usadas como agentes de biocontrole na agricultura devido a produção de lipopeptídeos cíclicos e biosurfactantes provenientes das famílias de surfactinas, iturinas e fengicinas (Ongena & Jacques, 2008). De acordo com Isa et al. (2017), os lipopeptídeos da família surfactina (surfactina, lichenisinas e pumilacidinas) são produzidos por várias cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. natto* e *B. pumilus*, que demonstraram atividades antibacterianas (contra *S. aureus*) e também atividades antifúngicas.

Policetídeos representam um grupo de metabólitos secundários, exibindo grande diversidade tanto em termos de estrutura e função. Produtos naturais policetídeos são conhecidos por possuir uma riqueza de atividades farmacologicamente importantes, incluindo antibacteriana, antifúngica,



antiparasitária, antitumoral e propriedades agroquímicas. O gênero *Bacillus* produz três tipos de PKs, incluindo bacillaene, difcidina e macrolactina (Zhao et al., 2016). Arbsuwan et al. (2018) identificaram macrolactina como sendo responsável pela ação antagonista de *Bacillus licheniformis* BFP011 frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

## 2.6 Grupo do *Bacillus subtilis*

O grupo do *B. subtilis* compreende as seguintes espécies: *B. subtilis sensu stricto*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* e *B. sonorensis* (figura 3) (Alina et al., 2015). As espécies do grupo *Bacillus subtilis* são intensamente estudadas devido a sua importância na indústria biotecnológica e agricultura (Mishra & Kumar, 2012).

As quatro espécies originais do grupo (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*) foram descobertos há mais de 40 anos (Priest et al., 1977). A capacidade das espécies desse grupo de formar endósporos de sobrevivência e a infinidade de compostos antimicrobianos produzidos, têm gerado um crescente interesse industrial para a aplicação desses compostos como conservantes de alimentos, agentes terapêuticos e biopesticidas (Caulier et al. 2019).

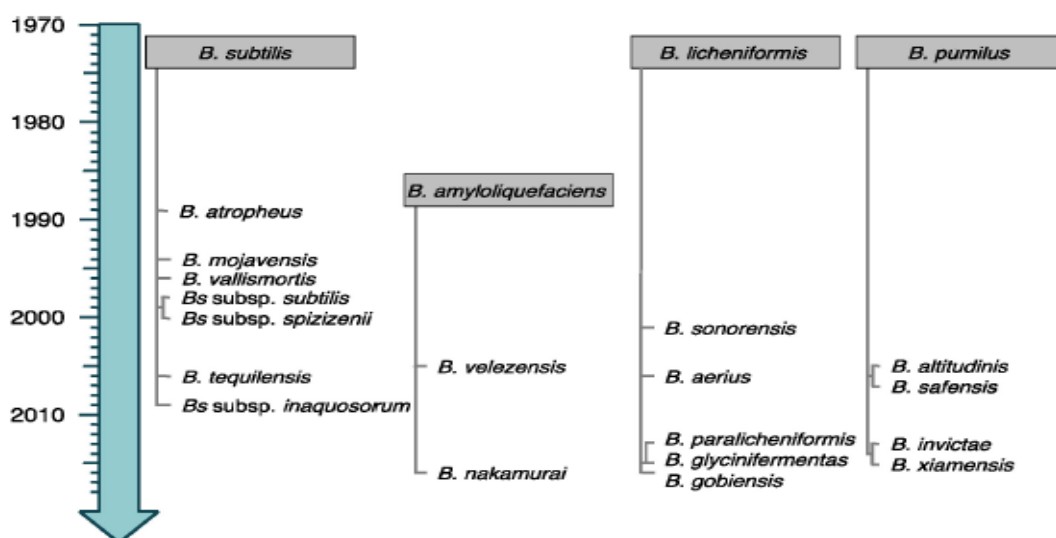


Figura 3. Taxonomia (timeline) do grupo *B. subtilis* (Caulier et al., 2019).

Cada vez mais, os membros do grupo foram desenvolvidos para serem usados como melhoradores de alimentos para animais e agentes de biocontrole antifúngicos. Há muito que o grupo é reconhecido por produzir uma variedade de metabólitos secundários e, apesar de sua longa história de uso seguro, isso resultou em um foco maior em sua segurança (Harwood et al., 2018).

Além de peptídeos não-ribossomais e policetídeos, diversas espécies desse grupo também podem produzir interessantes peptídeos antimicrobianos sintetizados pelos ribossomos, como as bacteriocinas (figura 4).

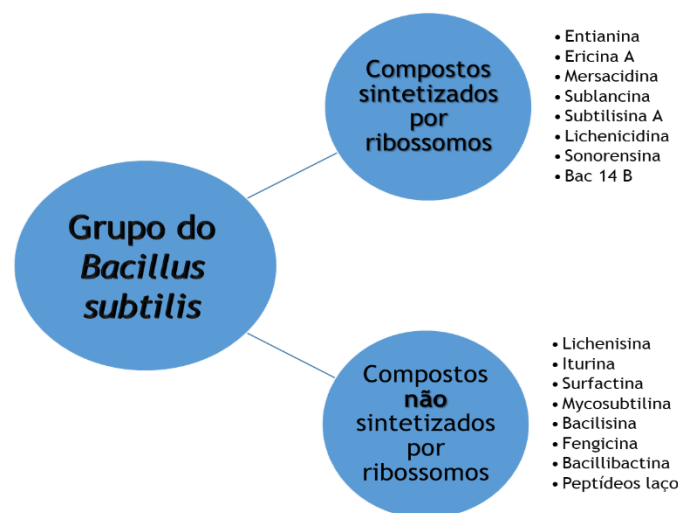


Figura 4. Compostos antimicrobianos produzidos pelo grupo *Bacillus subtilis* (Adaptado de Caulier et al., 2019).

Os membros do grupo são amplamente distribuídos no solo, onde ajudam a reciclar carbono e nitrogênio através da produção e secreção de hidrolases macromoleculares tais como proteases, amilases e celulasas. Harwood et al. (2018) ressaltam que os membros do grupo *B. subtilis* são extremamente importantes por produzirem uma ampla variedade de metabólitos secundários.

## 2.7 *Bacillus licheniformis*

São móveis, anaeróbios facultativos, Gram-positivos, formam esporos elipsoidais a cilíndricos, situados centralmente, paracentralmente e subterminalmente em esporângios não inchados. A morfologia das colônias é variável, dentro e entre as cepas, e, como acontece com *Bacillus subtilis*, pode dar a aparência de cultura mista. Apresentam temperatura de crescimento variando entre 15°C a 55°C, pH entre 5,7 e 6,8, podendo crescer na concentração de até 7% de NaCl. Amplamente distribuído no solo e em muitos outros ambientes, incluindo leite e outros alimentos, e amostras clínicas e veterinárias, sendo relatado ocasionalmente como um agente patogênico oportunista ao homem e outros animais, e como uma causa de intoxicações alimentares (Logan e de Vos, 2009).

*Bacillus licheniformis* têm sido utilizados amplamente em vários aspectos da indústria da biotecnologia, como na fabricação de enzimas, antibióticos e bioquímicos. Filogeneticamente está intimamente relacionado ao *B. subtilis* (espécie mais estudada no gênero *Bacillus*) (Gao et al., 2015).

Têm sido demonstrados que diversas cepas de *B. licheniformis* são capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana (Tabela 2).

As bacteriocinas de *B. licheniformis* são geralmente estáveis a mudanças de pH e resistentes a altas temperaturas, da ordem dos 100°C (Abriouel et al., 2011). A bacitracina 29 foi o primeiro antibiótico peptídico de síntese não ribossomal derivado de culturas de *B. licheniformis* e tem sido amplamente aplicada nas áreas da medicina humana e veterinária, exibindo atividade contra estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Johnson et al., 1945; He et al., 2006).

Tabela 2: Compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus licheniformis*

Estirpes	Compostos antimicrobianos	Microrganismos alvo	Referência
26 L-10/3RA	Lichenina	<i>Streptococcus bovis</i> e <i>Eubacterium ruminantium</i> .	Pattnaik et al., 2001
490/5	Bacilocina 490	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus smithii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> .	Martirani et al., 2002

P40	Lipopeptídeo cíclico (surfactina ou lichenisina)	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> e isolados clínicos do <i>Streptococcus</i> spp.	Cladera- Olivera et al., 2004; Teixeira et al., 2009
ZJU12	Bacitracina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592322, <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA e <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Alternaria</i> <i>brassicae</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> .	He et al., 2006
ATCC 14850	Lichenicidina	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA e <i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina	Begley et al., 2009
DSM 13	Lichenicidina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.	Dischinger et al., 2009
VK21	Lichenicidina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp, <i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Staphylococcus. aureus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus globigii</i> , <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> and <i>Mycobacterium phlei</i>	Shenkarev et al., 2010
BL-09	Lichenisina Mersacidina	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> e <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> .	Gao et al., 2015
BFP011	Macrolactonas Amicoumacinas	<i>Bacillus amyloliquences</i> TISTR 1045; <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> ATCC 11778; <i>Bacillus licheniformis</i> TISTR 1010; <i>Bacillus pumilus</i> TISTR 905; <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008; <i>Bacillus subtilis</i> TISTR; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228; <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; <i>Escherichia coli</i> O157:H7; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 17736; <i>Salmonella typhi</i> ATCC 5784.	Arbsuwan et al., 2018
JS	Peptídeo antibacteriano	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> .	Waghmare et al., 2019
BL1	Bacitracina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Mussa et al., 2020

*B. licheniformis* P40, isolado do peixe *Leporinus* sp., de origem nativa da bacia amazônica, produz uma bacteriocina que pode ser usada como um

bioconservante, no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos, entre os quais pode-se destacar *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (Cladera-Oliveira et al., 2004). Esta bacteriocina, foi identificada como um lipopeptídeo cíclico, também apresenta eficiência no combate ao desenvolvimento da putrefação em batatas, que é uma fitopatogenia causada por *Erwinia carotovora* (Teixeira et al., 2009)

*B. licheniformis* ZJU12 foi isolado do solo e apresentou capacidade de produção de peptídeos antimicrobianos, como a bacitracina, com amplo espectro de atividade frente a bactérias gram-positivas e espécies patogênicas de fungos, com exceção de bactérias gram-negativas (He et al., 2006).

*B. licheniformis* 189, uma cepa termotolerante, apresentou genes de biosíntese para lichenisinas e bacitracinas, além da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Mendo et al., 2004).

Arbsuwan et al. (2017) identificaram macrolactonas e amicoumacinas como principais constituintes antimicrobianos do sobrenadante da cultura de células *B. licheniformis* BFP011 com amplo espectro de ação frente a diversas bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.

Waghmare et al. (2019) purificaram o peptídeo antimicrobiano produzido pelo *B. licheniformis* JS, que mostrou atividade antimicrobiana contra organismos Gram-negativos em menor extensão do que Gram-positivos. Além disso, o peptídeo antimicrobiano apresentou efeito combinatório com antibióticos (canamicina, neomicina e estreptomicina) aumentando a eficiência dos mesmos.

Em virtude dos fatos mencionados, as diversas estirpes do *Bacillus licheniformis* se destacam devido a produção de uma variedade de metabólitos secundários e PAMs que não só auxiliam a sua sobrevivência em seu ambiente nativo, como também tornam promissor o estudo dessa espécie seja para a produção de novos compostos antimicrobianos (Harwood et al., 2018; Waghmare et al., 2019).

### 3. TRABALHOS

DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE THERMOPHILIC BACTERIUM  
*BACILLUS licheniformis* SMIA-2, AN ANTIMICROBIAL- AND THERMOSTABLE  
ENZYME-PRODUCING ISOLATE FROM BRAZILIAN SOIL<sup>1</sup>

Samara Pinto Custodio Bernardo<sup>a</sup>, Albert Remus R. Rosana<sup>b,\*</sup>, Adriane Nunes de Souza<sup>a</sup>,  
Sorina Chiorean<sup>b</sup>, Meire Lelis Leal Martins<sup>a</sup>, John C. Vederas<sup>b</sup>

Running title: Draft genome sequence *Bacillus licheniformis* SMIA-2

---

<sup>1</sup>Artigo publicado na Revista Microbiology Resource Announcements. DOI:  
10.1128/MRA.00106-20

<sup>a</sup>Food Technology Laboratory, State University of North Fluminense, Campos dos  
Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

\*Address correspondence to: Albert Remus R. Rosana, [rosana@ualberta.ca](mailto:rosana@ualberta.ca)

## ABSTRACT

*Bacillus licheniformis* SMIA-2, a thermophilic and thermostable enzyme-producing bacterium, is found to be active against several strains of *Staphylococcus aureus* and several *Bacillus* species. Here, we report the 4.30 Mbp draft genome and bioinformatic prediction supporting gene inventories for amylase, protease, cellulase, xylanase and antimicrobial compound biosynthesis.

*Bacillus* sp. SMIA-2 is an important Brazilian strain for the production of industrially-relevant thermostable enzymes such as amylases (1), xylanases (2), proteases (3) and cellulases (4, 5) utilizing diverse industrial fermentation substrates such as whey, sugarcane bagasse, corn steep liquor and food-waste (6, 7). SMIA-2 was isolated in 2001 from the soil of Rio de Janeiro, Brazil. Serially diluted soil was plated on tryptone-saline-yeast extract agar (TSYA), incubated at 65 °C for 24 h and single colony isolate SMIA-2 was maintained on TSYA (8). The strain was phylogenetically categorized with thermophilic *Bacillus* group 5 with 94% similarity with *B. caldxylolyticus* (Accession No. AH010483.2) (8). Our re-sequencing of the 16S rRNA gene (Accession No. MN645931) revealed that SMIA-2 is 100% identical with the type strain, *Bacillus licheniformis* Gibson 46<sup>T</sup>. We embarked in sequencing the genome of SMIA-2 for it is an important strain used in agricultural waste fermentation (6), laundry detergent development (9) and thermostable enzyme production (4-7) for second generation bioethanol production in Brazil.

Genomic DNA was purified from a 12-h culture grown in Brain Heart Infusion broth (50 °C, 200 rpm) using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol for Gram-positive bacterial DNA extraction. DNA was quantified using Qubit v2.0 and sequencing libraries were created using Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA) and sequenced using the NextSeq reagent kit

(2×150 bp). Default parameters were used for all software unless otherwise specified. FastQC v0.11.8 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) was used to inspect quality of the sequences and quality trimming based on Phred quality scoring 20 and SolexaQA v3.0 (10). Trimmed reads were *de novo* assembled using IDBA-UD v1.1.1. (11) implemented in Microbial Genome Atlas (MiGA) Pipeline v0.3.6.2 (12). The draft genome sequence was annotated using the NCBI PGAP v4.8 (13). Taxonomic classification was established using MiGA v0.5.0.0 (12); calculation of the average nucleotide identity v0.90 (14) and digital DNA:DNA hybridization using the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v2.1 server (15).

SMIA-2 genome showed an ANI of 99.71% and alignment fraction of 0.97 with *Bacillus* sp. H15-1 whereas a comparison with the closest type strain *B. licheniformis* Gibson 46<sup>T</sup> has an ANI of 99.57% (AF = 0.95) supporting the placement of SMIA-2 under the species *B. licheniformis*. SMIA-2 is a novel strain as revealed by dDDH values <79% (formula 2). Paired-end sequencing yielded 46,616,926 reads (233× coverage). The draft genome is 4,292,816 bp in 34 contigs ( $N_{50} = 317,403$  bp) and G+C = 45.85%.

Genome annotation detected 4322 coding sequences, 11 rRNA genes and 79 tRNAs. The genome encodes gene inventories supporting thermostable enzyme production while a total of 13 gene clusters for putative biosynthetic secondary metabolites were predicted using antiSMASH v5 (16). A summary of the genome scan highlights 5 of the 10 clusters (Table 1). Lastly, the thermostable enzymatic activities of SMIA-2 (1-4) can be supported by gene inventories including six amylase genes; 13 loci for xylose metabolism, 55 protein degradation-associated loci and three cellulolytic enzyme loci under a putative cellulosome complex (17).

---



**Data Availability.** The whole genome project for *Bacillus licheniformis* SMIA-2 has been deposited in DDBJ/ENA/GenBank under accession number [JAACZZ000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JAACZZ000000000). The version described in this paper is the first version, JAACZZ010000000 under BioProject number [PRJNA602865](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA602865), BioSample number [SAMN1390944](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN1390944) and Sequence Read Archives number [SRX7638223](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX7638223).

## ACKNOWLEDGEMENTS

S.P.C.B. was funded by a PhD Scholarship from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A.R.R.R. was funded by a Vanier Canada Graduate Scholarship, Alberta Innovates-Technology Future, and a President's Doctoral Prize of Distinction. S.C. was supported by a NSERC Postgraduate Scholarship. M.L.L.M. was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors acknowledge the assistance of Sophie Dang from the Molecular Biology Service Unit for genome sequencing and Arlene Oatway for assistance in electron microscopy from the Advanced Microscopy Unit, University of Alberta.

## REFERENCES

1. Carvalho RV, Correa TLR, Da Silva JCM, Mansur LRCO, Martins MLL. 2008. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 39:102–107. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100023>
2. Cordeiro CAM, Martins ML, Luciano AB. 2002. Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 33:57-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000100012>.
3. da Silva CR, Delatorre AB, Martins ML. 2007. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity. *Braz J Microbiol* 38: 253-258. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.
4. Oliveira LR, Barbosa JB, Martins ML, Martins MA. 2014. Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. *Acta Sci Biol Sci* 36:215-222. <https://dx.doi.org/10.4025/actascibiols.v36i2.17827>.

5. Costa EA, Nunes R, Cruz E, Ladeira SA, Carvalho RV, Martins MLL. 2017. Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *J Microbiol Biotechnol* 2: 000115. <http://dx.doi.org/10.23880/oajmb-16000115>.
6. Barbosa JB, Ladeira SA, Martins MLL. 2014. Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatal Biotransformation* 32: 244-250. <http://dx.doi.org/10.3109/10242422.2014.934363>
7. Cruz E, de Moraes LP, Costa EA, Barbosa JB, Martins ML. 2019. Optimization of food-waste based culture medium for cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of divalent metal ions on activity and stability of the enzyme at higher temperatures. *Int J Adv Res Sci Eng Technol* 6:331-337. <https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.6741>
8. de Souza AN, Martins ML. 2001. Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz J Microbiol* 32:271-275. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>.
9. Ladeira SA, Cruz E, Delatorre AB, Barbosa JB, Leal Martins ML. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic J Biotechnol* 18:110-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>
10. Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ. 2010. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 11:485. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-485>
11. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. 2012. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28:1420-1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
12. RodriguezR LM, Gunturu S, Harvey WT, Rosselló-Mora R, Tiedje JM, Cole JR, Konstantinidis KT. 2018. The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Res* 46:W282. <https://doi.org/10.1093/nar/gky467>.
13. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614-6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
14. Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J. M., Kwon, S.J. & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* 110:1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>.
15. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*. 14:60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>

16. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* 47:W81-W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>.
17. Joshua AO, Li H, Thapa S, Scholz MB, Zhou S. 2017. Draft genome sequence of *Bacillus licheniformis* strain YNP1-TSU isolated from Whiterock Springs in Yellowstone National Park. *Genome Announc.* 5(9):e01496-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01496-16>.

**TABLE 1** Summary of antiSMASH results for *Bacillus licheniformis* SMIA-2

Predicted biosynthetic metabolite	Contig Number	Coordinates within the contig	% Similarity to known cluster
NRPS	4	189027-243708	100 (lichenysin biosynthetic gene cluster)
NRPS	5	147101-175615	53 (fengycin biosynthetic gene cluster)
Lasso peptide	9	111876-134337	0 (no known biosynthetic gene cluster)
Lanthipeptide	9	198527-225488	100 (lichenicidin biosynthetic gene cluster)
NRPS	21	1-20181	46 (bacillibactin biosynthetic gene cluster)

## FUNCTIONAL GENOMICS CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF A THERMOPHILIC BACTERIUM SMIA-2<sup>1</sup>

### **Abstract**

As the number of bacterial and fungi antibiotic-resistant strains increases considerably, new challenges arise in the infection's treatment and the investigation for new microorganisms with antimicrobial activity is extremely important. *Bacillus* sp. SMIA-2, a thermophilic bacterium, has established itself as an excellent producer of enzymes, such as proteases, xylanase, amylase, and cellulase. The re-sequencing of the 16S rRNA gene demonstrated a 100% similarity with *Bacillus licheniformis* ATCC 14580T. The phylogenetic comparison of the complete genome with closest strains by the TYGS web server strongly supported the placement of SMIA-2 strain in the *licheniformis* species. The genome encodes several inventories genes for the biosynthesis of bioactive compounds, such as lichenicidin, lichenysin, and multiple bacteriocins. The investigation of the antimicrobial potential of SMIA-2 was also carried out and it was observed that SMIA-2 has antimicrobial activity in several pathogenic microorganisms. Once the genetic characteristics are known, as well as the potential for antimicrobial activity has been revealed, it can be concluded that *Bacillus licheniformis* SMIA-2 is a promising microorganism for the development of new antimicrobial compounds that can be used clinically and as a biocontrol agent in food production.

*Keywords:* *Bacillus licheniformis*; genome sequencing; antimicrobial potential; bacteriocin.

---

<sup>1</sup> Parte da tese de doutorado que será submetida para publicação na Biotech Journal

## Introduction

Antimicrobial peptides are found in almost all living organisms with diverse chemical structures and play a crucial role in the innate immunity of defense systems in protecting their hosts from invasive pathogens (Benitez et al., 2011). The genus of *Bacillus*, one of the most abundant bacterial strains found in soil, is known to produce antimicrobial substances, including peptide and lipopeptide antibiotics, and bacteriocins (Abriouel et al., 2011; Alvarez-Ordóñez et al., 2014). The production of a wide range of hydrolytic enzymatic systems, the production of metabolites that have antagonistic effects on other microorganisms, as well as its capacity to form extremely resistant spores, allow *Bacillus* species to survive in different ecosystems (Lee et al., 2016; Abriouel et al., 2011; Barbosa et al., 2014; Wiegand et al., 2013; Amin et al., 2015; Latorre et al., 2016). Besides, this genus has a history of safe use in both the food and pharmaceutical industries (Leães et al., 2015).

*Bacillus* is the source of several enzymes of current industrial interest like amylases, proteases, cellulases, and lipases, which are the main enzymes consumed worldwide and have applications in a wide range of products and industrial processes. *Bacillus* spores are also being used extensively as probiotic food supplements, where they are used in humans as dietary supplements and in feed for livestock and aquaculture as growth promoters and competitive exclusion agents (Nath et al., 2015). Thus, *Bacillus* members have great potential for applications in the medical, agricultural, and pharmaceutical industries.

*Bacillus* sp. SMIA-2 a Gram-positive, aerobic, thermophilic, spore-forming bacterium is known to produce important enzymes for industrial use such as proteases (Silva et al. 2007), amylases (Carvalho et al. 2008<sup>a,b</sup>), pectinases (Andrade et al. 2011), and cellulases (Oliveira et al. 2014; Ladeira et al. 2015; Costa

et al. 2017; Cruz et al., 2019) in submerged cultures employing both pure and complex carbon sources. Phylogenetic analysis showed that this strain is a member of the *Bacillus* rRNA group 5, which includes *Bacillus stearothermophilus* and other thermophilic *Bacillus* spp. (Souza and Martins, 2001).

Currently, the availability of whole-genome sequencing and readily available bioinformatics tools have become a powerful approach for the identification of gene clusters associated with the synthesis of substances useful for biotechnology (Chavali and Rhee, 2018; Weber and Kim, 2016), such as antimicrobial compounds and enzymes. Recently, the entire *Bacillus* sp. SMIA-2 genome was sequenced and relevant gene clusters, including genes for ribosomal synthesized antibacterial peptides and thermostable enzymatic activities, were identified (Bernardo et al. 2020). Despite many studies on the production of enzymes by the SMIA-2, no studies have been done so far on the production of antimicrobial substances.

This work was analyzed the whole genome sequence of *Bacillus* sp. SMIA-2 and subsequently studied its potential to produce secondary metabolites with desirable antimicrobial properties.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains**

The bacterial strain investigated in this study is a thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2, previously isolated from a soil sample collected in Campos dos Goytacazes city, Rio de Janeiro, Brazil (Souza and Martins, 2001). Indicator microorganisms used in the screening for antimicrobial activity were summarized in Table 1. The American Type Culture Collection (ATCC) strains were obtained from Instituto Nacional de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil and the clinical strains were provided by the Laboratório Sanidade Animal (LSA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

Table 1. Indicator microorganisms for the antibacterial and antifungal activity assays

Strains	Relevant (Phenotype)	Reference
<b>Gram-positive Bacteria</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Methicillin-susceptible	Stenholm et al., 2009.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	Methicillin-resistant	Lemaire et al., 2008.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Toxic-shock syndrome and staphylococcal scarlet fever	Sharma et al., 2018.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	Methicillin-susceptible	Stenholm et al., 2009.
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	Not-hemolytic	Mohan et al., 2019.
<i>Staphylococcus aureus</i> 1 (SA 1)	Clinical strain, CCTA	This study
<i>Staphylococcus aureus</i> 5 (SA 5)	Clinical strain, CCTA	This study
<i>Staphylococcus aureus</i> 7 (SA 7)	Clinical strain, CCTA	This study
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 (SE 2)	Clinical strain, CCTA	This study
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 6 (SE 6)	Clinical strain, CCTA	This study
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	Clinical strain, CCTA	This study
<i>Enterococcus</i> sp.	Clinical strain, CCTA	This study
<b>Gram-negative Bacteria</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Non-invasive, non-cytotoxic	Zhu et al., 2002.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Producer of the biosurfactant rhamnolipid	Mai-Prochnow et al., 2015.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$\beta$ -Hemolytic	Traub and Leonhard, 1994.
<i>Escherichia coli</i> O126:H27	Enteraggregative <i>E. coli</i>	Shazberg et al., 2003.
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Invasive, non-typhoidal	García et al., 2018.
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13096	Invasive, cytotoxic	Quilodrán-Vega et al., 2016.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) producer	Podschun and Ullmann, 1998.
<i>Enterobacter</i> sp.	Clinical strain	This study
<b>Fungal strain</b>		
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	Biofilm producer and azole drugs resistant	Schwarz Müller et al., 2014.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Biofilm and proteinase producers	Quilodrán-Vega et al., 2016.

## Genome: sequencing information and analysis

The draft genome and the secondary metabolite bioinformatic predictions of *Bacillus* sp. strain SMIA-2 were described previously by Bernardo et al. (2020). The whole-genome sequencing was deposited to the GenBank databases under accession number JAACZZ010000000. Species identity was established by calculating the average nucleotide identity (ANI), while the strain novelty via the *in silico* digital DNA-DNA hybridization (dDDH) using the ANI Calculator OrthoANLu v0.90 server (Yoon et al., 2017) and the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) version 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013), respectively, against previously sequenced genomes in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The alignment and genome comparisons for phylogenetic tree analysis were performed using the Type (Strain) Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff and Göke, 2019) and the phylogenetic tree was constructed using FastME version 2.1.6.1 (Lefort et al., 2015). The numbers above the branches are GBDP (Genome Blast Distance Phylogeny) pseudo-bootstrap support values from 100 replications. The evaluation of pseudo-bootstrap for internal branches was obtained from 100 replications.

Genome annotation was performed using three automated genome annotation pipelines: (1) the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016); (2) the Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) v2.0 server (Aziz et al., 2008); (3) the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)). The whole genome of SMIA-2 was aligned with the closed genomes of the type strain *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> and the closest but different species as *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup> to generate a chromosome map using the CGViewer (Grant and Stohard, 2008).

The prediction of secondary metabolites was performed using antiSMASH



version 5 server (Blin et al., 2019) including gene clusters of putative bacteriocins, non-ribosomal peptides synthase (NRPS), ribosomally-synthesized, post-translationally modified peptides (RiPPs), polyketide synthetase (PKS) while other bacteriocins were further verified using a web-based bacteriocin genome mining tool version 4 (BAGEL4) server (van Heel et al., 2018). The analysis was performed with a full probabilistic biosynthetic gene cluster (BGC) detection and ClusterFinder algorithm. The biosynthetic gene cluster gene inventories were further cross validated by reciprocal blast analysis with the NCBI protein database using Basic Local Alignment Search Tool protein (BLASTp).

#### Transmission electron microscopy

The transmission electron microscopy (TEM) was performed according to (Rosana et al. 2016) with some adaptations. The SMIA-2 cells were fixed and stained with osmium tetroxide 1% followed by sequential dehydration using an increasing concentration of ethanol, ethanol: Spurr resin mixture, and, finally, in Spurr resin matrix. Ultramicrosections were prepared using a Reichert - Jung Ultra Cut E microtome, supported on nickel-plated gratings, and stained sequentially with a solution containing uranyl acetate and lead citrate. The colored sections were visualized using a Morgagni 268 TEM (Philips, FEI, Hillsboro, OR, USA) equipped with a GatanOrion CCD camera and analyzed with the Morgagni 268 v3.0 software.

#### Culture, media conditions and antimicrobial activity assays

For screening of antimicrobial activity of *Bacillus* sp. SMIA-2, the overlay assay was performed (Benitez et al., 2011; Coventry et al., 1996). An 18-h culture was placed into plates with Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, England) agar with a sterilized metal needle and incubated at 50 °C for 12-h in aerobic conditions. After

incubation, a layer of 8 ml of soft BHI agar (0.8% w/v agar) containing a suspension with  $1.5 \times 10^8$  colony forming units per ml (0.5 McFarland unit) of each designated indicator microorganisms (Table 1) was poured over the plates. After incubation under appropriate conditions for each microorganism, growth inhibition was detected by the appearance of a clear zone around the producer strain, which was measured using a digital caliper (Vernier caliper, Model 316119, MTX). The plates without SMIA-2 strain were also inoculated and tested as controls.

In order to use the supernatant for antimicrobial activity, a fermentation was performed as follow: 50 mL of BHI broth in 250 mL Erlenmeyer flasks were inoculated with 10% inoculum ( $1 \times 10^6$  cfu ml<sup>-1</sup>) of standard cultures of SMIA-2 and incubated at 50 °C in an orbital shaker (Thermo Forma, Ohio, USA) operated at 150 rpm for different incubation times. At time regular intervals flasks were withdrawn and analyzed for growth (OD600nm) and pH. The contents were then centrifuged (HERMLEZ 382 K, Wehingen, Germany) (15 min at 10 000 x g) at 4 °C and the cell-free supernatant was used for antimicrobial activity assay.

The antimicrobial activity of SMIA-2 cell-free supernatant against *Staphylococcus aureus* ATCC 1600 was investigated by the agar disk diffusion method (Hudzicki, 2009). A suspension with  $1.5 \times 10^8$  cfu of *Staphylococcus aureus* ATCC 1600 was spread with sterilized swabs in Mueller-Hinton agar plates. The supernatant was filtrated using a 0.22 µm Millipore filter to obtain a cell-free fermentation broth and sterile cellulose discs (6 mm) were placed aseptically on the plates and impregnated with 10 µL of the cell-free supernatant and incubated at 37°C. The zones of inhibition around the disks were measured after 18 - 24 h. The sensitivities of *Staphylococcus aureus* ATCC 1600 to the cell-free supernatant were determined by measuring the sizes of inhibitory zones on the agar surface around

the disks using a Vernier caliper (Model 316119, MTX). Besides, the strain *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 was chosen because of its sensitivity to the cell-free supernatant.

The biomass cell was measured by centrifuging 10 mL of culture in BHI broth for 20 min at  $2\ 830 \times g$ , washed with distilled water twice, and dried in the oven at 80°C for 24 h. The experiments were carried out in duplicates and the results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## Results and Discussion

### Genomic features of strain SMIA-2

*Bacillus* has long been regarded as a phylogenetic heterogeneous group (Ash et al., 1991) and over the years reclassification of species and numerous novel species of genus *Bacillus* were reported and at the same time, many new genera of Bacillaceae were established (Ash et al., 1993; Shida et al., 1997; Nazine et al., 2001; Dasmn et al., 2002; Wang, 2009). The analysis of the 16S rRNA gene of SMIA-2 performed by Souza and Martins (2001), showed that this organism is phylogenetically closely related to members of the genus *Bacillus* rRNA group 5 (*B. stearothersophilus*, *B. flavothermus*, *B. thermoglucosidasius* and *B. caldoxylolyticus*). The levels of similarity ranged from 90% to 91% from *B. stearothersophilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermoleovorans*, *B. denitrificans*, *B. flavothermus*, and *B. thermoglucosidasius* to 94% for *B. caldoxylolyticus* and *Bacillus* sp strain AK1. However, the works of Bernardo et al. (2020) based on analysis of 16S rRNA gene sequence revealed the degree of similarity between *Bacillus* sp. SMIA-2 and the closest related species, *Bacillus licheniformis* Gibson 46<sup>T</sup> was 100%. Also, the SMIA-2 genome showed an average nucleotide identity

(ANI) and DNA-DNA hybridization (DDH) values, which together with the phylogenetic comparison of the complete genome with the closest strains by TYGS web server, strongly supported the placement of SMIA-2 strain in the *licheniformis* specie.

Based on 16S rRNA phylogenetic analyses, Logan and de Vos (2009) state that the family Bacillaceae is paraphyletic and composed of species misassigned to the genus *Bacillus* as well as genera misassigned to the family. Moreover, Bandhari et al. (2013) explained that sometimes the genus *Bacillus* is a phylogenetically incoherent taxon with members of the group, lacking a common evolutionary matter. These statements could justify the phylogenetic misclassification by Souza and Martins (2001).

Besides, new rules for the description of a new species have been applied, whereas that a strain exhibiting values above 97% will point towards those species 16S rRNA gene similarities with other members of the genus, should be included in DNA–DNA reassociation experiments (Stackebrandt and Swiderski, 2008). Moreover, the genus *Bacillus* is a large heterogeneous group consisting of highly diverse organisms (Bhandari et al. 2013). According to Logan and de Vos (2009), the misclassification of species in the genus has historically been a problem resulting in a repeated redefinition of the genus and reorganization of its constituent species. Based on the evolution distance, the whole genome phylogeny analysis is described in Figure 1. Kaya-Ongoto et al. (2019) reported that *Bacillus* spp. may be divided into nine groups (groups I–IX), based on their high-level phylogeny or phenotypic features linked to 16S rRNA gene sequence similarity. *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. altitudinis*, *B. mojavensis*, *B. safensis*, *B. circulans*, and *B. atropheus* belong to group I (Bandhari et al., 2013).

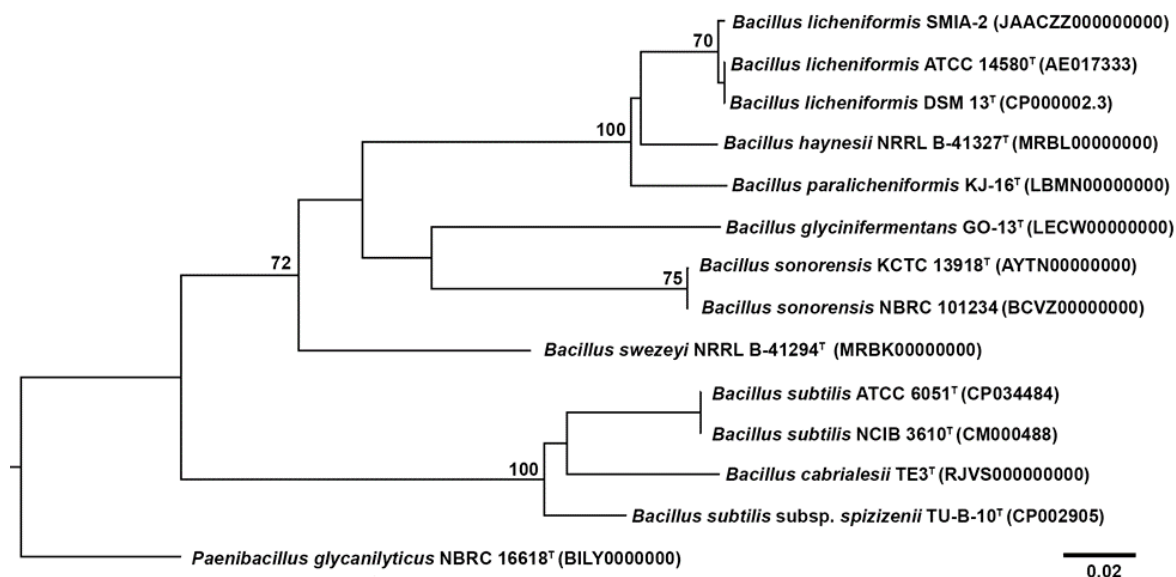


Figure 1. Whole-genome phylogenetic tree of *Bacillus* sp. SMIA-2. The tree was inferred with FastME 2.1.6.1 including SPR postprocessing from the GBDP distances calculated from the genome sequences. The branch lengths are scaled in terms of GBDP distance formula  $d_5$ . The numbers above the branches are GBDP pseudo-bootstrap support values >60% from 100 replications, with average branch support of 63.6%.

The degree of similarity between *Bacillus* sp. SMIA-2 and its closest related species type strain *Bacillus licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> is 100% for 16S rRNA sequence level. With the average nucleotide identity (ANI) of 99.57% (alignment fraction, 0.95) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) values up to 70%, supporting the placement of SMIA-2 in the species *B. licheniformis* (Bernardo et al., 2020). The bootstrap values ranged from 72% to 100% from *B. licheniformis* DSM13<sup>T</sup>, *B. haynesii* NRRL B-41327<sup>T</sup>, *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup>, *B. glycinifermentans* GO-13<sup>T</sup>, *B. sonorensis* KCTC 13918<sup>T</sup> and NBRC 101234, *B. swezeyi* NRRL B-41294<sup>T</sup>, *B. subtilis* ATCC 6051<sup>T</sup> and NCIB 3610<sup>T</sup>, *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup> and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10<sup>T</sup>. *Paenibacillus glycanilyticus* NBRC

16618<sup>T</sup> was used as an outgroup due to the fact it is the most distant related group of organisms that serves as a reference group when determining the evolutionary relationship of the ingroup. It had been classified as species *Bacillus*, but it was associated with novel genera because of its distinct phylogenetic positions (Dasman et al., 2002).

*B. licheniformis* DSM13<sup>T</sup> is an isogenic strain to *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup> (Hoffmann et al., 2010; Veith et al., 2004). In addition, Dunlap et al. (2017) identified *B. haynesii* NRRL B-41327<sup>T</sup> and *B. swezeyi* NRRL B-41294<sup>T</sup>, in which the two strains shared a close relationship with *B. subtilis* group strains. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence showed that *B. haynesii* NRRL B-41327<sup>T</sup> share the highest identity (99.7 %) with the type strains of *B. sonorensis* (99.7 %) and *B. paralicheniformis* (99.7 %), while *B. swezeyi* NRRL B-41294<sup>T</sup> was found to share similarly high levels of nucleotide sequence identity with the type strains of *B. sonorensis* (99.2 %) and *B. licheniformis* (99.1 %).

Phylogenomic analysis of *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup> indicated that the strain was most closely related to *Bacillus sonorensis* KCTC-13918<sup>T</sup> (99.5 % similarity) and *Bacillus licheniformis* DSM 13<sup>T</sup> (99.4 %) (Dunlap et al., 2015). Strains of *B. glycinifermentans* GO-13<sup>T</sup> according to Kim et al. (2015) were related most closely to *Bacillus sonorensis* KCTC-13918<sup>T</sup> and *Bacillus licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>. *B. sonorensis* was isolated from desert soil, it is phenotypically most closely related to *Bacillus licheniformis* (Palmisano et al., 2001). Rey et al. (2004) estimated that 80% of the *B. licheniformis* genome sequence contains orthologous genes of *B. subtilis*. The type strains NCIB 3610 and ATCC 6051 are highly similar and are likely descendants of the original Marburg strain (Kabisch et al., 2013). De los Santos Vilallobos et al. (2019) confirmed that *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup> belongs to the genus *Bacillus* and it is closest related with *B. subtilis* NCIB 3610<sup>T</sup> and *B. subtilis* subsp.

*spizizenii* TU-B-10<sup>T</sup>. Furthermore, Nakamura et al. (1999) pointed out that *B. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10<sup>T</sup> has a distant phylogenetic relationship to *B. licheniformis* by low DNA relatedness values ranging from 13 to 39 %.

Similarities of the phenotype characteristics of SMIA-2 and phylogenetically related species of the genus *Bacillus* findings were shared among all analyzed type strains (Table 2). Souza and Martins (2001) described SMIA-2 as a Gram-positive motile bacillus, with subterminal to terminal spores, ellipsoidal in shape (Figure 2).

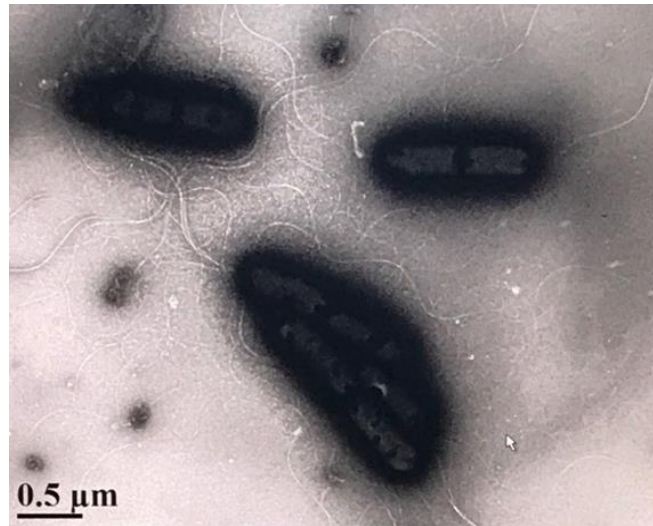


Figure 2. Transmission electron micrograph (TEM) of SMIA-2 showing flagellated cell and ellipsoidal endospore.

According to Logan and de Vos (2009), the family Bacillaceae contains *Bacillus* and 18 other genera. The majority of taxa are aerobic or facultatively anaerobic chemo-organotrophic rods that possess Gram-positive type cell-wall structures and that form endospores. However, there are exceptions to all of these characteristics including strict anaerobes, autotrophs, cocci, and organisms that do not form endospores.

These results showed that the SMIA-2 and the related type strains are a

phenotypically coherent group of bacilli displaying very high similarity among their 16S rRNA sequences.



Table 2: Differentiation of *Bacillus* sp. SMIA-2 from closely related *Bacillus* species. Strains: 1<sup>a</sup>, SMIA-2; 2<sup>b</sup>, *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup>; 3<sup>c</sup>, *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>; 4<sup>d</sup>, *B. haynesii* NRRL B-41327<sup>T</sup>; 5<sup>e</sup>, *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup>; 6<sup>f</sup>, *B. glycinifermentans* GO-13<sup>T</sup>; 7<sup>g</sup>, *B. sonorensis* KCTC 13918<sup>T</sup>; 8<sup>d</sup>, *B. swezeyi* NRRL B-41294<sup>T</sup>; 9<sup>h</sup>, *B. subtilis* ATCC 6051<sup>T</sup>; 10<sup>i</sup>, *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup>; 11<sup>j</sup>, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10<sup>T</sup>; 12<sup>k</sup>, *Paenibacillus glycanilyticus* NRBC 16618<sup>T</sup>.

Characteristic	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>	6 <sup>f</sup>	7 <sup>g</sup>	8 <sup>d</sup>	9 <sup>h</sup>	10 <sup>i</sup>	11 <sup>j</sup>	12 <sup>k</sup>
<b>Isolated from</b>	Soil	Soil	Soil	Soil	Fermented soybean food product	Korean fermented soybean paste	soil desert	Soil	Marburg strain	Wheat (Triticum turgidum subsp. durum)	Tunisian desert (strain 168/ NRRL B-23049 <sup>T</sup> )	Soil
<b>Gram reaction</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Colony colour</b>	Yellowish	Opaque to white	Opaque to white	Creamy white	Creamy white	Creamy white	Yellowish-cream	Creamy white	NI	White, circular, flat, opaque	White, circular, irregular	Pinkish yellow
<b>Spore shape</b>	ellipsoidal	ellipsoidal to cylindrical	ellipsoidal to cylindrical	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	NI	cylindrical	cylindrical	ellipsoidal
<b>Swollen sporangia</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	NI	-	-	+
<b>Growth at:</b>												
<b>pH</b>	7.0 (6.5 – 9.0)	6.0 – 8.0	6.0 – 8.0	7.0 (5.5 – 10.0)	7.0	7.0	5.0 – 7.0	7.0	NI	6.0–8.0	5.0 – 6.0	5.0 – 7.0
<b>temperature</b>	50°C	15°C - 55°C	15°C - 55°C	37°C	37°C	37°C	15°C - 55°C	37°C		28±30°C	28±30°C	28±37°C
<b>oxygen requirements</b>	Aerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic	Aerobic	Strictly aerobic	Strictly aerobic	Facultatively aerobic
<b>% NaCl</b>	5.0	7.0	7.0	0.0 - 12	> 10	>8.0	3.0	0.0 - 12	NI	2.0	7.0	<5.0
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	+	+	+
<b>Nitrate reduction</b>	+	+	+			+	+			+	+	NI
<b>Hydrolysis of:</b>												
<b>casein</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	+	+	-
<b>starch</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	NI	+	+	+
<b>Gelatine</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	NI			-

\* +, Positive; -, negative; NI, Not Inferred. T: Type strain. a: data from Souza and Martins, 2001; b: data from Manachini et al., 1998; c: data from Manachini et al., 1998; d: data from Dunlap et al., 2017; e: data from Dunlap et al., 2015; f: data from Kim et al., 2015; g: data from Palmisano et al., 2001; h: data from Kabisch et al., 2013; i: data from de los Santos Vilallobos et al., 2019; j: data from Nakamura et al., 1999; k: data from Dasman et al., 2002.

Whole-genome sequencing revealed a total size of 4,292,816 bp in 34 contigs, with a G + C of 45.85% (Bernardo et al., 2020). The RAST annotation has allocated these genes into 734 subsystems, the most abundant of which are genes that are associated with carbohydrate (15.6%), followed by amino acid and derivatives metabolism (13.8%), and cofactors, vitamins, prosthetic groups, pigments (8.3%). The 4.30 Mbp complete circular chromosome map of SMIA-2, as aligned against *B. licheniformis* ATCC 14850<sup>T</sup> and *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup> is presented in Figure 3.

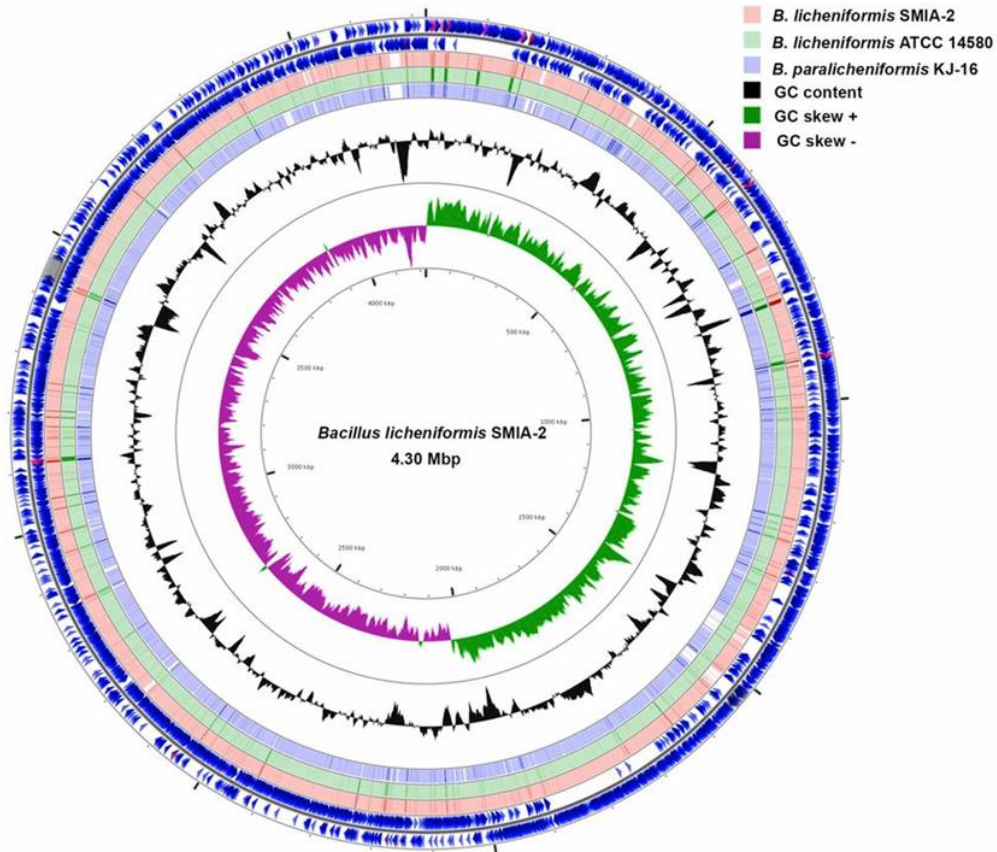


Figure 3. Graphical circular map of the chromosome of *Bacillus licheniformis* SMIA-2 genome. The outermost circle shows predicted coding regions transcribed on the forward (clockwise) DNA strand. The second circle shows predicted coding regions transcribed on the reverse (counterclockwise) DNA strand. The next three rings show the positions of BLAST hits detected through Blastn comparisons of the sequence against *B. licheniformis* SMIA-2, *B. licheniformis* ATCC 14580<sup>T</sup>, and *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup>. The next two rings show GC content and GC skewness. Each is plotted as the deviation from the average for the entire sequence.

Antimicrobial activity of *Bacillus licheniformis* SMIA-2 and genetic basis for its pathogen's inhibition

For studies of antimicrobial activity of *B. licheniformis* SMIA-2 cells, the BHI was chosen for its ability to support both growths of indicator microorganisms and

*B. licheniformis* SMIA-2. BHI is a nutrient-rich culture medium that is widely used for the growth of a variety of microorganisms including bacteria, yeasts and mold, even those fastidious (Kadam et al., 2013; Yang et al., 2018). Thus, for a correct assessment of the interaction between SMIA-2 and the selected pathogens, all of them were all grown in the same medium and their best environmental growth conditions.

Among the microorganisms tested, *Staphylococcus* spp. was found to be the most sensitive microorganism (Table 3). *Staphylococcus aureus* is a pathogen that causes various life-threatening human diseases (Lin and Peterson, 2010) and *Staphylococcus pseudointermedius* is an important colonizer and pathogens of dogs, cats, and other domesticated and wild animals (Limbago, 2016; Machado and Machado, 2017).

Yilmaz et al. (2006) reported several strains of *Bacillus* spp. isolated from soils that did not show inhibitory effects against Gram-negative strains, but that were effective against *Staphylococcus aureus*, similar to what was observed in this study. Moreover, Mendo et al. (2004) reported a thermostable *Bacillus licheniformis* strain which demonstrated activity against several Gram-positive strains such as *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Staphylococcus aureus* sp.

Table 3. Antimicrobial activity spectrum by overlay assay of *Bacillus licheniformis* SMIA-2 against indicators strains

Indicators strains	Relevant Phenotype	Inhibition zone (mm)
<b>Gram-positive</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> 5	Clinical strain	5.71 ± 0.37
<i>Staphylococcus aureus</i> 7	Clinical strain	5.57 ± 0.37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	Methicillin-resistant	5.26 ± 0.23
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	Clinical strain	4.13 ± 0.34
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 6 (SE 6)	Clinical strain	2.81 ± 0.14
<i>Staphylococcus aureus</i> 1 (SA 1)	Clinical strain	2.41 ± 0.53
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 (SE 2)	Clinical strain	2.41 ± 0.60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Methicillin-susceptible	1.41 ± 0.06
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	Methicillin-susceptible	1.22 ± 0.14
<i>Enterococcus</i> sp.	Clinical strain	1.34 ± 0.48
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	Not-hemolytic	1.12 ± 0.16
<b>Gram-negative</b>		
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Invasive, non-typhoidal	3.0 ± 0.95
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	β-Hemolytic	2.28 ± 0.07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Producer of the biosurfactant rhamnolipid	2.05 ± 0.88
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Extended-spectrum-β-lactamase (ESBL) producers.	2.28 ± 0.34
<i>Escherichia coli</i> O126:H27	Enteroaggregative <i>E. coli</i>	1.89 ± 0.44
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13096	Invasive, cytotoxic	1.55 ± 0.45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Not invasive, not cytotoxic	0.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinical strain	0.0
<i>Enterobacter</i> sp.	Clinical strain	0.0
<b>Fungi</b>		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Biofilm and proteinase producers	3.44 ± 1.02
<i>Candida galbrata</i> ATCC 2001	Biofilm producer and azole drugs resistant	2.15 ± 0.01

Members of *Bacillus* spp. are known to produce a wide arsenal of antimicrobial substances, including peptide, lipopeptide antibiotics, and bacteriocins (Abriouel et al., 2011).

In order to assess the biological activity of *B. licheniformis* SMIA-2 exometabolites released into fermentation broth, the organism was grown in BHI medium and the antimicrobial activity of supernatant was studied using *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 as microorganism indicator.

Before antimicrobial activity assays were carried out, the changes in medium

pH and culture density were also followed during cultivations of *Bacillus licheniformis* SMIA-2. As showed in Figure 4, the SMIA-2 had a short exponential growth phase in cultures shaken at 50°C, reaching the highest OD 600 value after 4 h, probably due to the higher inoculum size used in fermentation combined with the nutrient-rich composition of the culture medium. In general, non-specific media such as Mueller–Hinton (MH) and BHI are used to produce antimicrobial substances due to abundant sources of nutrient, carbon, nitrogen, vitamins and minerals (Lajis, 2020).

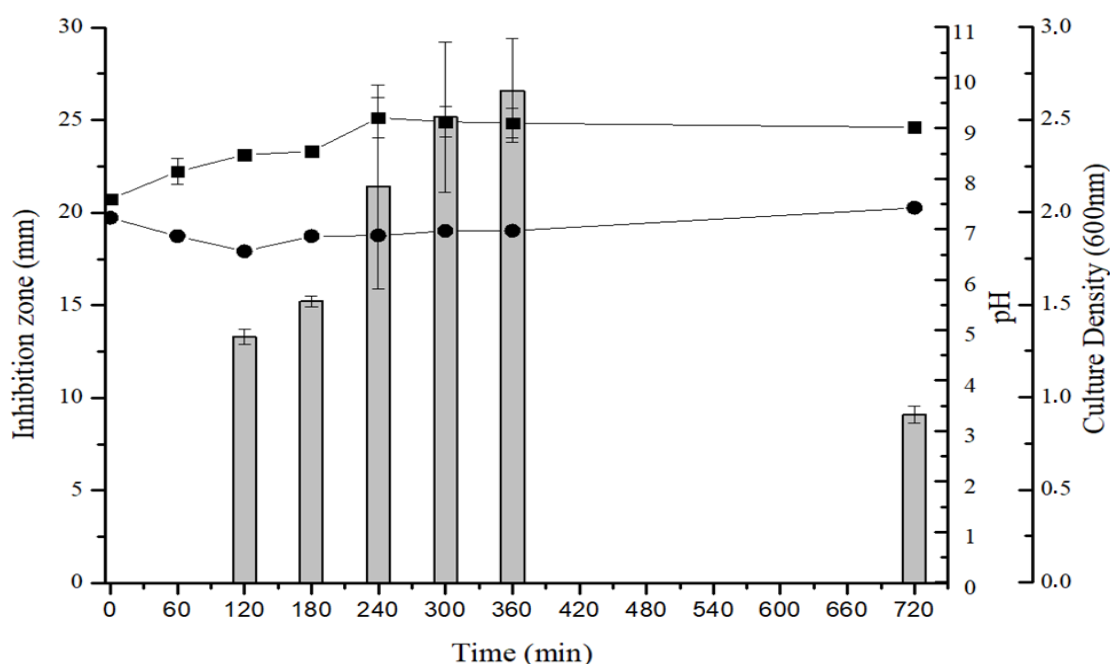


Figure 4. Growth (▪), pH (●) and antimicrobial activity (—) of cell-free supernatants of *B. licheniformis* SMIA-2 cultivated in BHI medium at 50°C. Results are means of two independent determinations. Bars correspond to standard deviation.

The formation of an inhibition zone against *S. aureus* (ATCC 12600) started during the exponential growth phase (2 h) and continued till late stationary phase growth, were reached a maximum value (26.6 mm). It is known that the antimicrobial

substances may be produced mainly by the secondary metabolite pathway under the nutritionally limited conditions (Ruiz et al., 2010). The production of a bacteriocin-like peptide by *B. amyloliquefaciens* B10 was detected at the late logarithmic growth phase (Karaoglu et al., 2014). In addition, the production of bacteriocin from *Bacillus* strain 8A started at the early exponential phase and continued till the stationary growth phase (Salem et al., 2009).

The medium pH declined from 7.22 to 6.56 within 120 min and started to rise until it reached 7.42 within 720 min. This decline in the medium pH during the exponential growth phase might be due to the production of acid by the use of glucose present in the BHI medium and the rise in pH could be attributed to the consumption of organic acids (Yang et al., 2018).

*Bacillus sp.* has been reported to produce several antibacterial and antifungal compounds including nisin, subtilin, cerein, coagulin, licheniocin, chitinase and serine protease (Waghmare et al. 2019; Vadakedath and Halami, 2019). The SMIA-2 genome analysis using antiSMASH showed 5 gene clusters involved in the biosynthesis of secondary metabolites. There were 3 gene clusters belonging to non-ribosomal peptide synthesis (NRPs) (Lichenysin, Fengycin, Bacillibactin) and two gene clusters belonging to ribosomal peptide synthesis (Lichenicidin and Lasso peptide) (Bernardo et al. 2020). Both antiSMASH 5.0 and BAGEL 4.0 servers also predicted gene clusters for lichenicidin, sonorensin, and lasso peptide biosynthesis (figure 5).

Although *Bacillus licheniformis* has been known to produce several bacteriocins, Zhao and Kuipers (2016) identified and described known and putative bacteriocins, non-ribosomally synthesized peptides (NRPs), polyketides (PKs) from 328 whole-genome sequenced strains of 57 species of Bacillales and claimed that

*B. licheniformis* are excellent producers of all the three kinds of antimicrobials (ribosomally synthesized antimicrobials, NRPs or PKs). According to Madslie et al. (2013) in most of *B. licheniformis* strains is present the gene cluster responsible for lichenysins, a non-ribosomally synthesized cyclic lipopeptide biosurfactants, with antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacterial strains including MRSA strains (Das et al., 2008).

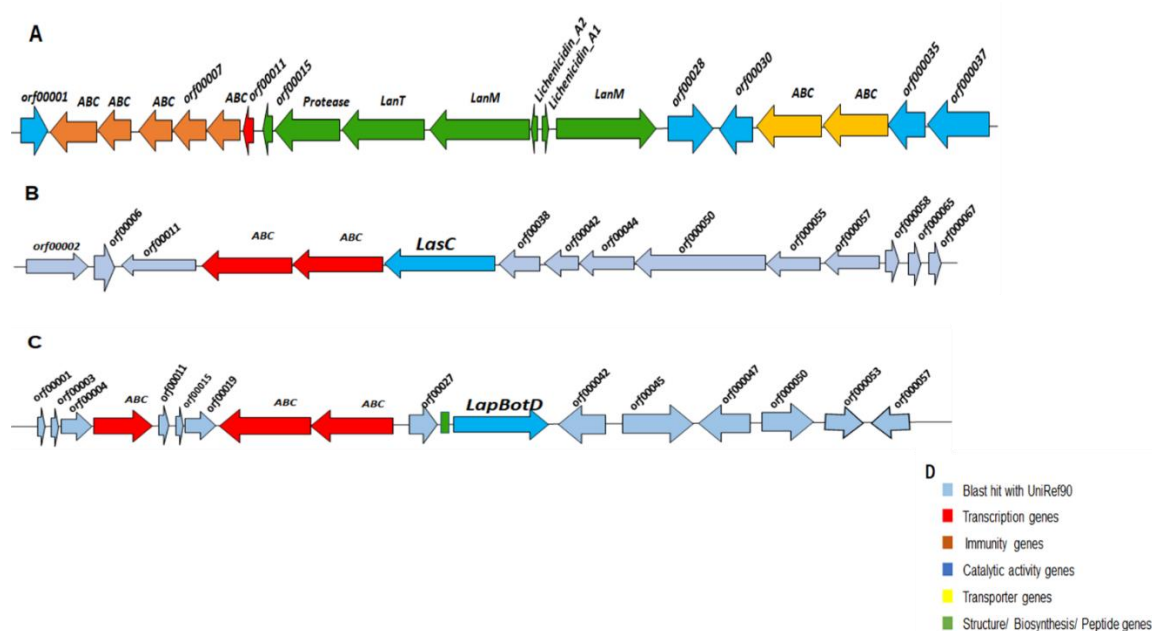


Figure 5. Secondary metabolite biosynthetic gene cluster organization in SMIA-2. Gene clusters for lichenicidin (A), an unidentified lasso peptide (B) and sonorensin (C) biosynthesis as predicted by antiSMASH v5.0 and BAGEL 4.0. Color legend for Fig.5a, b, c is presented in D.

*Bacillus licheniformis* SMIA-2 have previously been shown to harbor the gene cluster to produce the bacteriocin lichenicidin, previously described to be produced by the type strain *B. licheniformis* ATCC14580<sup>T</sup> (Rey et al., 2004). Lichenicidin-producing by *B. licheniformis* strains isolated from retail infant milk formulae showed



activity against *Staphylococcus aureus*, including an MRSA strain (Ordóñez et al., 2013). Moreover, Chopra et al. (2015) predicted that sonorensin, a bacteriocin, was found to be efficient active against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Harwood et al. (2018) emphasized that *B. licheniformis* strains have been shown several gene clusters associated with the synthesis of secondary metabolites, such as lanthipeptide lichenicidin, lichenysins, bacillibactin-like and unidentified lasso peptides.

Cochrane and Vederas (2014) argued that lipopeptides produced by *Bacillus* spp. are strong antimicrobials. These lipopeptides are known as surfactins, iturins, lichenysins, fengycins, and polymyxins that have a range of functions such as antibacterial, antifungal, anticancer and antiviral. In addition, Du et al. (2019) claimed that antibiotic production by *Bacillus* spp. enhances the fitness of the production strains and suppresses plant pathogens that would otherwise harm plant health.

The massive numbers of bacteria with whole-genome sequence data made possible to identify an informative set of putative antimicrobial gene clusters across the genomes that can be developed into new antimicrobials (Zhao and Kuipers, 2016).

## **Conclusion**

The study of the genetic characteristics of the bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 strongly supports the placement of SMIA-2 in the species *licheniformis*.

The SMIA-2 strain cells showed antimicrobial potential against several strains of *Staphylococcus aureus*. The maximum production of the antimicrobial substances against *S. aureus* (ATCC 12600) was found in the late stationary phase

growth of the microorganism. The SMIA-2 genome analysis using antiSMASH 5 and BAGEL 4.0 predicted gene cluster for lichenicidin, sonorensin, and lasso peptide biosynthesis, suggesting that the antimicrobial substances found in the SMIA-2 supernatant of cultures containing BHI may belong to these lipopeptides.

Lastly, with this data, functional and comparative genomics studies can be initiated and may ultimately lead to new strategies for improving biotechnology for the production of enzymes and antibiotics with *Bacillus licheniformis* SMIA-2, representing a potential source of antibiotic candidates.

### **Acknowledgements**

S.P.C.B. was funded by a PhD Scholarship from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A.R.R.R. was funded by a Vanier Canada Graduate Scholarship, Alberta Innovates-Technology Future, and a President's Doctoral Prize of Distinction. S.C. was supported by a NSERC Postgraduate Scholarship. M.L.L.M. was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of Interest: No competing interests are declared by any of the authors.

### **References**

- Abriouel H, Franz C M A P, Omar N B, Gálvez A (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol Rev 35: 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>.
- Andrade MVV, Delatorre AB, Ladeira SA, Martins MLL (2011). Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor.

Ciênc. Tecnol. Aliment. 31(1): 204-208. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100031>

Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Clifford T, Deasy T, Considine K, O'Connor P, Hill C (2013). Investigation of the Antimicrobial Activity of *Bacillus licheniformis* strains Isolated from Retail Powdered Infant Milk Formulae. *Probiotics Antimicrob Proteins*; 6(1):32-40. doi:10.1007/s12602-013-9151-1

Amin M, Rakhisi Z, Ahmady A Z (2015). Isolation and Identification of *Bacillus* species from Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. *Avicenna J Clin Microb Infec. February*; 2(1): e23233. <https://doi.org/10.17795/ajcmi-23233>

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. (2008). The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*,9:75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75

Barbosa J B, Gentil N O, Ladeira S A, Martins M L L (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal Biocatalysis and Biotransformation*, v. 32 - Issue 4. <https://doi.org/10.3109/10242422.2014.934363>

Bhandari V, Ahmod NZ, Shah HN, & Gupta RS (2013). Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(7): 2712–2726. doi: 10.1099/ijs.0.048488-0

Benitez L, Correa A P, Dariot D, Brandelli A (2011) Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is Enhanced in the Presence of *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 62:1017–1022. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9814-z>

Bernardo SPC, Rosana ARR, de Souza AN, Chiorean S, Martins MLL, Vederas JC

- (2020). Draft genome sequence of thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an antimicrobial- and thermostable enzyme producing isolate from Brazilian soil. *Microbiol Resour Announc* 9: e00106-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00106-20>
- Carvalho RV, Côrrea TL, daSilva JC, de Oliveira LRM, Martins ML (2008)<sup>a</sup>. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* SP. *Braz J Microbiol.* 39(1):102-107. doi:10.1590/S1517-838220080001000023
- Carvalho RV, Corrêa TLR, daSilva JCM, Viana AP, Martins MLL (2008)<sup>b</sup>. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(2): 380-386. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>
- Cochrane SA, Vederas JC (2014). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal research reviews* 36 (1): 4-31. <https://doi:36.10.1002/med.21321>
- Coventry MJ, Wan J, Gordon JB, Mawson RF, Hickey MW (1996). Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. *J Appl Bacteriol* 80: 91 -98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03194.x>.
- Costa EA, Fernandes RN, Cruz E, Moraes LP, Carvalho RV, Martins MLL (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *J Microbiol Biotechnol*, 2(1): 000115. doi:10.23880/OAJMB-16000115
- Chavali AK, Rhee SY (2018). Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites. *Brief Bioinform.* 19(5):1022-1034. doi:10.1093/bib/bbx020.
- Cruz E, deMoraes LP, Costa EA, Barbosa JB, Martins, MLL (2019). Optimization of

Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. *Int. J. Adv. Res. Sci. Eng. Technol.* 6 (7):331-336.

Dasman, Kajiyama S, Kawasaki H, et al. (2002). *Paenibacillus glycanilyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produced by the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 5):1669-1674. doi:10.1099/00207713-52-5-1669

Das P, Mukherjee S, Sen R (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol*, 104(6):1675-1684. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x

Dunlap CA, Kwon SW, Rooney AP, Kim SJ (2015). *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(10):3487-3492. doi:10.1099/ijsem.0.000441

Dunlap CA, Schisler DA, Perry EB, Connor N, Cohan FM, Rooney AP (2017). *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(8):2720-2725. doi:10.1099/ijsem.0.002007

García V, Mandomando I, Ruiz J, Herrera-León S, Alonso PL, Rodicio MR (2018) *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis causing mixed infections in febrile children in Mozambique. *Infect Drug Resist* 11:195-204. doi:10.2147/IDR.S147243.

Grant JR, Stothard P (2008). The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue): W181-W184. doi:10.1093/nar/gkn179

Hoffmann K, Wollherr A, Larsen M, Rachinger M, Liesegang H, Ehrenreich A,

- Meinhardt F (2010). Facilitation of direct conditional knockout of essential genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by comparative genetic analysis and manipulation of genetic competence. *Appl Environ Microbiol*, 76:5046–5057. doi: 10.1128/AEM.00660-10
- Hudzicki J (2009) Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology.
- Kabisch J, Thürmer A, Hübel T, Popper L, Daniel R, & Schweder T (2012). Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host. *Journal of biotechnology*. 163. 10.1016/j.jbiotec.2012.06.034.
- Kadam SR, den Besten HM, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol*. 165(3):259-264. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025
- Karaoglu SS, Sevim A, Sevim E (2014) Production and characterization of bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus amyloliquefaciens* B10. *Sevim ve ark., Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30(5):338-345, 2014.
- Kaya-Ongoto MD, Kayath CA, Nguimbi E, Lebonguy AA, Nzaou SAE, Wilson PSE, Ahombo G. (2019). Genetic Clearness Novel Strategy of Group I *Bacillus* Species Isolated from Fermented Food and Beverages by Using Fibrinolytic Enzyme Gene Encoding a Serine-Like Enzyme. *Journal of Nucleic Acids*, v.2019, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/5484896>
- Kim SJ, Dunlap CA, Kwon SW, Rooney AP (2015). *Bacillus glycinifermentans* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(10):3586-3590. doi:10.1099/ijsem.0.000462
- Ladeira SA, Cruz E, Delatorre AB, Barbosa JB, Martins MLL (2015). Cellulase

production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, pp.110–115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>

Lajis, AFB (2020). Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. *Bioresour. Bioprocess.* (7) 8. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0295-z>

Latorre J D, Hernandez-Velasco X, Wolfenden R E, Vicente J L, Wolfenden A D, Mencon, A, Bielke L, Hargis B M, Tellez G (2016) Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front. Vet. Sci.* 3:95. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00095>

Leães F L, Vanin N G, Sant'Anna V, Brandelli A (2011) Use of Byproducts of Food Industry for Production of Antimicrobial Activity by *Bacillus* sp. P11. *Food Bioprocess Technol*, 4:822–828. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0410-9>.

Lee J Y, Shim J M, Yao Z, Liu X, Lee K W, Kim H J, Ham K S, Kim J H (2016) Antimicrobial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* EMD17 Isolated from Cheonggukjang and Potential Use as a Starter for Fermented Soy Foods. *Food Sci. Biotechnol.* 25(2): 525-532. <https://doi.org/s10068-016-0073-z>

Lemaire S, Olivier A, Van Bambeke F, Tulkens PM, Appelbaum PC, Glupczynski Y (2008) Restoration of susceptibility of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams: comparison of strains, cells, and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 52(8):2797-805. doi: 10.1128/AAC.00123-08.

Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast

distance-based phylogeny inference program. *Mol Biol Evol.* 2015;32: 2798–2800. DOI: 10.1093/molbev/msv150

Limbago BM (2016) What's in a Name? The Impact of Accurate *Staphylococcus pseudintermedius* Identification on Appropriate Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* Mar. 54(3): 516–517. [https:// doi: 10.1128/JCM.03091-15](https://doi.org/10.1128/JCM.03091-15).

Logan, N. A. & De Vos, P. (2009). Genus *Bacillus* Cohn 1872. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 3, pp. 21–128. Edited by P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. R. Rainey, K. H. Schleifer & W. B. Whitman. New York: Springer

Machado AB, Machado MFR, Picolli SU (2017) An investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in domestic and shelter dogs in Montenegro (RS-Brazil). *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 18(4):542-548. [https:// doi.org/10.1590/S1519-99402017000400005](https://doi.org/10.1590/S1519-99402017000400005).

Manachini PL, Fortina MG, Levati L, Parini C (1998). Contribution to phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus licheniformis* and description of new genomovars. *Syst Appl Microbiol*, 21(4):520-529.[doi:10.1016/S0723-2020\(98\)80064-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80064-7)

Madslien EH, Rønning HT, Lindbäck T et al. (2013). Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *J Appl Microbiol*; 115:1068–80. [doi: 10.1111/jam.12299](https://doi.org/10.1111/jam.12299)

Mendo S, Faustino NA, Sarmiento AC, Amado F, Moir AJG (2004) Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Biotechnol. Lett.* 26: 115–119. [doi.org/10.1023/B:BILE.0000012888.72489.3f](https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000012888.72489.3f).



- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.
- Meier-Kolthoff JP, Göker M. (2019) TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.* 2019;10: 2182. DOI: 10.1038/s41467-019-10210-3
- Mohan V, Wibisono R, de Hoop L, Summers G and Fletcher GC (2019) Identifying Suitable *Listeria innocua* Strains as Surrogates for *Listeria monocytogenes* for Horticultural Products. *Front Microbiol* 10(2281):1-14. doi: 10.3389/fmicb.2019.02281.
- Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM (1999). Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 49(Pt 3):1211-1215. doi:10.1099/00207713-49-3-1211
- Nath S, Chowdhury S, Dora K C (2015) Application of *Bacillus* sp. as a biopreservative for food preservation. *Int. Journal of Engineering Research and Applications*. Vol. 5, Issue 4, (Part -2), pp.85-95.
- Oliveira LR, Barbosa JB, Martins ML, Martins MA (2014). Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. *Acta Sci. Biol. Sci.* 36 (2): 215-222.
- Palmisano MM, Nakamura LK, Duncan KE, Istock CA, Cohan FM (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 5):1671-1679. doi:10.1099/00207713-51-5-1671
- Podschun R, Ullmann U (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens:

- Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 1(4): 589–603. R. doi: 10.1128/CMR.11.4.589.
- Quilodrán-Vega SR, Villena J, Valdebenito J, Salas MJ, Ruiz A, Kitazwa H, García A (2016). Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Can J Microbiol* 62:514-524. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0811>.
- Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, et al. (2004) Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*, 5(10):R77. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r77
- Rosana AR, Whitford DS, Fahlman RP et al. (2016) Cyanobacterial RNA helicase CrhR localizes to the thylakoid membrane region and cosediments with degradosome and polysome complexes in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*; 198:2089–99.
- Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Langley E (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167. doi:10.3109/10408410903489576
- Saleem F, Ahmad S, Yaqoob Z, Rasool S A (2009) Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria. *Pak J Pharm Sci.*, 22.3: p252.
- Stackebrandt E & Swiderski J (2008). From Phylogeny to Systematics: The Dissection of the Genus *Bacillus*. 10.1002/9780470696743.ch2.
- Schwarz Müller T, Ma B, Hiller E, Istel F, Tscherner M et al (2014) Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel

- antifungal tolerance genes. PLoS Pathog 10(6): e1004211. doi: 10.1371/journal.ppat.1004211.
- Sharma S, Chaudhry V, Kumar S, Patil PB (2018) Phylogenomic Based Comparative Studies on Indian and American Commensal *Staphylococcus epidermidis* Isolates. Front Microbiol 9: 333. doi: 10.3389/fmicb.2018.00333.
- Shazberg G, Wolk M, Schmidt H, Sechter I, Gottesman G, Miron D (2003) Enteroaggregative *Escherichia coli* Serotype O126:H27, Israel. Emerg Infect Dis 9(9):1170-1173. <https://dx.doi.org/10.3201/eid0909.020695>
- Silvia CR da, Delatorre AB, Martins MLL. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. Braz J Microbiol. 38(2): 253-258. doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012
- Souza AN, Martins MLL (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. Brazilian Journal of Microbiology, 32 (4), 271- 275. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>
- Stenholm T, Hakanen AJ, Vaarno J, Pihlasalo S, Terho P, Hänninen PE, Vuopio-Varkila J, Huovinen P, Kotilainen P (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening by online immunometric monitoring of bacterial growth under selective pressure. Antimicrob Agents Chemother 53(12):5088-94. doi: 10.1128/AAC.00518-09.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res,44:6614–24.
- Traub WH, Leonhard B (1994) Agar Disk Diffusion (Bauer-Kirby) Tests with Various Fastidious and Non-fastidious Reference (ATCC) Strains: Comparison of Several

- Agar Media. *Chemotherapy* 40(6): 374–383. doi:10.1159/000239296.
- van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers OP (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins, *Nucleic Acids Research*, 46 (W1): W278–W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>
- Waghmare S, Randive S, Jadhav D, Nadaf N, Parulekar R, Sonawane K (2019). Production of novel antimicrobial protein from *Bacillus licheniformis* strain JS and its application against antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Proteins and Proteomics*. 10. 17-22. 10.1007/s42485-018-00002-6.
- Weber T, Kim HU (2016). The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synth Syst Biotechnol*. 1(2):69-79. doi:10.1016/j.synbio.2015.12.002.
- Wiegand S, Voigt B, Albrecht D, Bongaerts J, Evers S, Hecker M, Daniel R, Liesegang H (2013) Fermentation stage-dependent adaptations of *Bacillus licheniformis* during enzyme production. *Microbial Cell Factories* 12:120. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-120>.
- Vadakedath N, Halami PM (2019). Characterization and mode of action of a potent bio-preservative from food-grade *Bacillus licheniformis* MCC 2016. *Prep Biochem Biotechnol*, 49(4):334-343. doi:10.1080/10826068.2019.1566141
- Veith B, Herzberg C, Steckel S, et al. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol*,7(4):204-211. doi:10.1159/000079829
- Yang E, Fan L, Yan J, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S, Walker B (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*; 8(1):10. doi:10.1186/s13568-018-0536-0.

- Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y (2006) Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological research* 161(2):127-31. doi: 10.1016/j.micres.2005.07.001.
- Yoon SH, Ha SM, Lim JM, Kwon SJ, Chun J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110:1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>.
- Zhao X, Kuipers OP (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 7(1):882. doi:10.1186/s12864-016-3224-y
- Zhu H, Thuruthyil SJ, Willcox MDP (2002). Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. *J Med Microbiol* 51(12):1063–1070 doi:10.1099/002

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

*Bacillus licheniformis* SMIA-2 é uma bactéria termofílica, com grande destaque na literatura como excelente produtor de uma variedade de enzimas, produzidas até mesmo em condições extremas de pH e temperatura. O aumento da resistência aos antibióticos traz a necessidade da descoberta de novos compostos naturais com ação antimicrobiana, despertando o interesse de investigar o potencial antimicrobiano de SMIA-2.

O primeiro trabalho forneceu informações quanto ao genoma do SMIA-2, no qual a partir do re-sequenciamento do gene 16S rRNA o grau de similaridade semelhança entre SMIA-2 e *Bacillus licheniformis* Gibson 46<sup>T</sup>, foi de 100%. A análise dos valores médios de identidade nucleotídica (ANI) e de hibridização do DNA-DNA (DDH), indicaram a colocação da cepa SMIA-2 na espécie *licheniformis*. Além disso a utilização da bioinformática através do antiSMASH v.5.0 permitiu a predição de genes responsáveis pela biosíntese de metabólitos secundários, tais como bacteriocinas e peptídeos não-ribossômicos.

No segundo trabalho dessa tese, a utilização de ferramentas de bioinformática para análise de todo genoma e a investigação do potencial antimicrobiano de SMIA-2 também foram realizados. As análises comparativas do genoma entre diversos gêneros e espécies possibilitaram a elaboração da árvore filogenética e comparações fenotípicas apoiaram fortemente a colocação da cepa SMIA-2 na espécie *licheniformis*. Através do mapa cromossômico pode-se observar a conservação de características genômicas entre SMIA-2, *B. licheniformis*

ATCC14580<sup>T</sup> e *B. paralicheniformis* KJ-16<sup>T</sup>. A análise do genoma do SMIA-2 usando BAGEL 4.0 previu o agrupamento de genes para a biossíntese de lichenidina, sonorensina e peptídeo laço não identificado. Para a investigação do potencial antimicrobiano foi realizada uma varredura com 22 microrganismos patogênicos e foi observado que o *Bacillus licheniformis* SMIA-2 possui atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos, principalmente contra *Staphylococcus* spp. A formação de halos de inibição do sobrenadante de culturas do SMIA-2 contendo meio BHI contra *S. aureus* (ATCC 12600) começou durante a fase de crescimento exponencial (2 h) do microrganismo e alcançou o máximo na fase estacionária de crescimento (26,6 mm), sugerindo que as substâncias antimicrobianas previstas pelo BAGEL 4 podem ser responsáveis por essa atividade antimicrobiana.

A análise do genoma e os resultados referente a atividade antimicrobiana destacam o *Bacillus licheniformis* SMIA-2 não só como um excelente produtor de enzimas, como também um microrganismo promissor na produção de substâncias com atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B., Gálvez, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1): 201–232.
- Acedo, J.Z., Chiorean, S., Vederas, J.C., Belkum, M.J.V. (2018) The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 42 (6): 805–828.
- Aguiar, E.L. (2015) *Sequenciamento, montagem e anotação do genoma de Streptococcus agalactiae GBS85147: uma abordagem comparativa*. Tese (Mestrado em Bioinformática) – Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 400p.
- Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Considine, K., O'Connor, P., Hill, C. (2013) Investigation of the Antimicrobial Activity of *Bacillus licheniformis* Strains Isolated from Retail Powdered Infant Milk Formulae. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6 (1): 32-40.
- Alina, S.O., Constantinescu, F., Petruta, C.C. (2015) Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters*, 20 (5): 10737 - 10750.
- Amin, M., Rakhisi, Z., Ahmady, A.Z. (2015) Isolation and Identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin*



*Microb Infec*, 2 (1): e23233.

- Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2011) Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (1): 204–208.
- Arbsuwan, N., Payoungkiattikun, W., Sirithorn, P., Daduang S., Jangpromma, N., Dhiravisit, A., Hahm Y.T., Neubert, L.K., Klaynongsruang, S. (2018) Purification and characterization of macrolactins and amicoumacins from *Bacillus licheniformis* BFP011: a new source of food antimicrobial substances, *CyTA Journal of Food*, 16 (1): 50-60.
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A. (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1): 108-160.
- Bahar, A. Ren, D. (2013) Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6 (12): 1543-1575.
- Barbosa, J.B., Gentil, N.O., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2014) Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32 (4): 244–250.
- Baron, G.B., Tejada, N.F.M., Pinheiro da Silva, F. (2018) Mammals' antimicrobial peptides: potential and limitations for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Rev Med*, 97(1): 59-70.
- Barros, D. de M., Melo, M. de A., Moura, D.F., Silva, J.H.L., Silva, M.L., Santos, J.S.S., Rocha, T.A., Oliveira, G.B., Ferreira, S.A. de O., Costa, M.P., Diniz, M.A., Melo, R.C.B.S., Leite, D.R. da S., Pontes, A.K., Silva, R.F., Leite, A.R. de F., Souza, J.C.V., Costa, M.P., Silva, A.M.R., Gomes, M. de V., Aguiar, G.B., Fonte, R. de A. B. (2020) Potencial utilização de sistemas antimicrobianos naturais como conservantes alimentares. *Braz. J. of Develop*, 6 (6): 40476-4049.
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., Caputo, L. (2011) Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Science against microbial*

*pathogens: communicating current research and technological advances*. A. Méndez-Vilas (Ed), 1102-1111.

- Bhandari, V., Ahmod, N. Z., Shah, H. N., Gupta, R. S. (2013) Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (7): 2712–2726.
- Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2009) Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Appl Environ Microbiol*, 75 (17):5451-5460.
- Boparai, J.K., Sharma, P.K. (2019) Mini review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein & Peptide Letters*, 27 (1): 4-16.
- Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008a) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28: 1-7.
- Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R.C., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008b) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 102-107.
- Carrim, A.J.I., Ribeiro, I.D.A., Araújo, M.V.F., Oliveira, B.,F.,R., Vieira, J.D.G. (2016) Atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de *Jacaranda decurrens* Cham. (carobinha-do-campo). *Enciclopédia Biosfera*, 13 (23): 1374-1385.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J. (2019) Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in microbiology*, 10, 302.
- Chang, C., Coggill, P., Bateman, A., Finn, R. D., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., Minor, W., Volkart, L., Joachimiak, A. (2009) The structure of pyogenecin immunity protein, a novel bacteriocin-like immunity protein from *Streptococcus pyogenes*. *BMC structural biology*, 9, 75.
- Chavali, A.K., Rhee, S.Y. (2018) Bioinformatics tools for the identification of gene

- clusters that biosynthesize specialized metabolites. *Brief Bioinform*, 19 (5):1022-1034.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., Brandelli, A. (2004) Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in applied microbiology*, 38 (4), 251–256.
- Contesini, F.J., Melo, R.R. de, Sato, H.H. (2017) An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38 (3), 321–334.
- Correa, T. L. R. (2009) *Produção simultânea de amilase e proteases pelo Bacillus sp. SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 76p.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. (2009) Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29: 1-7.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., Silva, R.F. (2011) Production and Properties of Xylanase from Thermophilic *Bacillus*. sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (4): 413-418.
- Costa, E.A., Fernandes, R.N., Cruz, E., Moraes, L.P., Carvalho, R.V., Martins, M.L.L. (2017) Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *J Microbiol Biotechnol*, 2 (1): 000115.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11 (2): 95–105.
- Cruz, E., de Moraes, L.P., Costa, E.A., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2019) Optimization of Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. *Int J Adv Res Sci Eng Technol*, 6 (7): 331-336.
- Dischinger, J., Josten, M., Szekat, C., Sahl, H.G., Bierbaum, G. (2009) Production of the Novel Two-Peptide Lantibiotic Lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM

13. PLOS ONE 4(8): e6788.

- Eldeen, I. M.S. (2014) Isolation of 12 Bacterial endophytes from some mangrove plants and determination of, antimicrobial properties of the isolates and the plant extracts. *International Journal of Phytomedicine*, v. 6, n. 3, p. 425-432.
- Flaherty, R.A., Freed, S.D., Lee, S.W. (2014) The wide world of ribosomally encoded bacterial peptides. *PLoS Pathog*, 10: e1004221.
- Gao, P., Yao, G., Bao, W., Li, J., Zhang, H., & Zhang, W. (2015) Complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* BL-09, a probiotic strain isolated from naturally fermented congee. *Journal of biotechnology*, 206, 58-9.
- Giongo, J.L. (2006) Produção, caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, 81p.
- Gomes, M.J.P. (2013) Gênero *Bacillus* spp. *In: Tópicos em Bacteriologia Veterinária*. Faculdade de Veterinária (UFRGS), Porto Alegre –RS.
- Guo, Y., Yu, Z., Xie, J. (2012) Identification of a new *Bacillus licheniformis* strain producing a bacteriocin-like substance. *J Microbiol*, 50: 452–458.
- Habibi, Y., Uggowitzer, K.A., Issak, H., Thibodeaux, C.J. (2019) Insights into the Dynamic Structural Properties of a Lanthipeptide Synthetase using Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc*, 141 (37): 14661-14672.
- Harwood, C.R., Mouillon, J.M., Pohl, S., Arnau, J. (2018) Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiol Reviews*, 42 (6):721-738.
- He, L., Chen, W., Liu, Y. (2006) Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological research*, 161 (4): 321–326.
- Hegedus, N., Marx, F. (2013) Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, 26:132-145.
- Horak, I., Engelbrecht, G., Jansen van Rensburg, P.J., Claassens, S. (2019)

- Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *Journal of Applied Microbiology*, 127: 326—343.
- Isa, M.H.M., Shannaq, M.A.H.F., Mohamed, N., Hassan, A.R., Al-Shorgani, N.K.N., Hamid A.A. (2017) Antibacterial Activity of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* MSH1. *Transactions on Science and Technology*, 4 (3): 402-407.
- Johnson, B.A., Anker, H., Meleney, F. L. (1945) Bacitracin: A New Antibiotic Produced by A Member of The *B. Subtilis* Group. *Science*, 102 (2650): 376–377.
- Kaya-Ongoto, M.D., Kayath, C.A., Nguimbi, E., Lebonguy, A.A., Nzaou, S.A.E., Wilson, P.S.E., Ahombo, G. (2019) Genetic Clearness Novel Strategy of Group I *Bacillus* Species Isolated from Fermented Food and Beverages by Using Fibrinolytic Enzyme Gene Encoding a Serine-Like Enzyme. *Journal of Nucleic Acids*, 2019: 1-14.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Revista Química Nova*, 1: 1-5.
- Ladeira, S.A. (2013) *Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanases por espécies de Bacillus sp.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 164p.
- Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2015) Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 110–115.
- Lajis, A.F.B. (2020). Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. *Bioresour. Bioprocess*, 7 (8): 1 - 26.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2): 139.
- Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R.E., Vicente, J.L., Wolfenden, A.D., Menconi, A., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G. (2016) Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial

Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front Vet Sci*, (3): 95.

Logan, N. A., de Vos, P. (2009). Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2.ed., New York: Springer, p. 21–128.

LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2020. Genus *Bacillus*. *Microbiology Society*. London - United Kingdom. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2010) *Microbiologia de Brock*. 12. ed.- Porto Alegre: Editora Artmed.

Marco, G.E. (2012) *Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de Bacillus sp.* Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Porto Alegre - RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, 87p.

Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., de Felice, M. (2002) Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact*, 1 (1): 1.

Martin-Gómez, H., Tulla-Puche, J. (2018) Lasso peptides: chemical approaches and structural elucidation. *Org Biomol Chem*, 16 (28): 5065-5080.

Maksimov, M.O., Pan, S.J., James, L.A. (2012) Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat Prod Rep*, 29 (9): 996-1006.

Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach M.A., Weber, T., Takano, E., Breitling, R. (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39: 339-346.

Mendo, S., Faustino, N.A., Sarmiento, A.C., Amado F., Moir, A.J.G. (2004) Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. *Biotechnology Letters*, (26): 115 – 119.

Monteiro, L. (2002) *Produção de substâncias bioativas de Bacillus spp. contra Xanthomonas campestris pv. campestris*. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Recife – PE, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 74p.

- Monteiro, V.N., Silva, R. N.(2009) Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, 3 (5): 9 – 23.
- Mishra, V.K., Kumar, A.R. (2012) Plant growth promoting and phytostimulatory potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal Of Agricultural And Biological Science*, 7, 509-519.
- Moshafi, M.H., Forootanfar, H., America Shakibaie, M., Dehghan-Noudeh, G., Razavi, M. (2011) Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Strain fas1 isolated from soil. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 24(3): 269-275.
- Mussa, A. H., Abdulkareem, A. F. and Kareem, M. K. A. (2020) Antimicrobial activity of novel peptide compound produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Iraqi soil on UTI bacteria. *Plant Archives*, 20 (1): 2447-2453.
- Oliveira, I. M. F. (2017) *Genômica comparativa e predição de Peptídeos antimicrobianos em genomas de Streptococcus isolados do rúmen bovino*. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola Vegetal) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 109p.
- Ongena M., Jacques P. (2008) Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, 16 (3): 115-125.
- Outtrup, H., Jørgensen, S.T. (2008) The Importance of *Bacillus* Species in the Production of Industrial Enzymes. *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, 206–218.
- Pattnaik, P., Kaushik, J.K., Grover, S., Batish, V. K. (2001) Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of applied microbiology*, 91(4): 636–645.
- Pinheiro da Silva, F., Machado, M. C. (2012) Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*, 36 (2): 308–314.
- Polonca, S. (2020). Environment Shapes the Intra-species Diversity of *Bacillus subtilis* Isolates. *Microb Ecol*, 79: 853–864.
- Priest, F.G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, 41(3): 711–753.

- Pushpendra, S., Rajesh, S., Ashish, K. S., Ravindra, S. (2018) Isolation of *Bacillus* spp. from Soil for Antimicrobial Production and Antibiotic Resistance. *Adv Biotech & Micro*, 8 (4): 555741.
- Roscia, G., Falciani, C., Bracci, L., Pini, A. (2013) The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. *Current Protein and Peptide Science*, 14: 641-649.
- Ribeiro, F. J., Przybylski, D., Yin, S., Sharpe, T., Gnerre, S., Abouelleil, A., Berlin, A. M., Montmayeur, A., Shea, T. P., Walker, B. J., Young, S. K., Russ, C., Nusbaum, C., MacCallum, I., Jaffe, D. B. (2012) Finished bacterial genomes from shotgun sequence data. *Genome research*, 22 (11): 2270–2277.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Langley, E. (2010) Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36 (2): 146–167.
- Shenkarev, Z. O., Finkina, E. I., Nurmukhamedova, E. K., Balandin, S. V., Mineev, K. S., Nadezhdin, K. D., Yakimenko, Z. A., Tagaev, A. A., Temirov, Y. V., Arseniev, A. S., Ovchinnikova, T. V. (2010) Isolation, structure elucidation, and synergistic antibacterial activity of a novel two-component lantibiotic lichenicidin from *Bacillus licheniformis* VK21. *Biochemistry*, 49 (30): 6462–6472.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 271-275.
- Sumi, C.D., Yang, B.W., Hahm, Y.T. (2015) Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol*, 61: 93–103.
- Stothard, P., Grant, J.R., Van Domselaar, G. (2019). Visualizing and comparing circular genomes using the CGView family of tools. *Brief Bioinform*, 20(4):1576-1582.
- Stoica, R.M., Moscovici, M., Tomulescu, C., Cășărică, A., Băbeanu, N., Popa, O., Kahraman, Ha. (2019) Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review. *Rom Biotechnol Lett*, 24 (6): 1111-1119.
- Teixeira, M.L., Cladera-Olivera, F., Santos, J., Brandelli, A. (2009) Purification and characterization of a peptide from *Bacillus licheniformis* showing dual antimicrobial and emulsifying activities. *Food Research International*, 42 (1):63-



68.

- Uyar, F., Baysal, Z. (2004) Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 39: 1893-1898.
- van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., Viel, J.H., Kok, J., Kuipers, O.P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins, *Nucleic Acids Research*, 46 (W1): W278–W281.
- Velásquez, J.E., Van der Donk, W.A. (2011) Genome mining for ribosomally synthesized natural products. *Current opinion in chemical biology*, 15: 11-21.
- Villarreal-Delgado M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1):95–130.
- Waghmare, S.R., Randive, S.A., Jadhav, D.B., Nadaf, N.H., Parulekar, R.S., Sonawane, K. D. (2019) Production of novel antimicrobial protein from *Bacillus licheniformis* strain JS and its application against antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Proteins and Proteomics*, 10: 17–22.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44 (D1): D1087–D1093.
- Wang, W., Sun, M. (2007) Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16s rDNA sequences. *Braz J Microbiol*, 40 (3): 505-521.
- Wilkinson, B., Micklefield, J. (2007) Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nature chemical biology*, 3: 379-386.
- Zhao, X., Kuipers, O.P. (2016) Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC genomics*, 17(1): 882.