

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**FISIOLOGIA DE *Bacillus subtilis* R14 SOB CONDIÇÕES RESTRITA E
IRRESTRITA DE OXIGÊNIO: PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E ESPORULAÇÃO**

André Lacerda Ulysses de Carvalho

RECIFE – 2005

André Lacerda Ulysses de Carvalho

**FISIOLOGIA DE *Bacillus subtilis* R14 SOB CONDIÇÕES
RESTRITA E IRRESTRITA DE OXIGÊNIO: PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS E ESPORULAÇÃO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DE PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadoras:

Prof^a. Dra. Ana Maria Souto Maior

Prof^a. Dra. Ester Ribeiro Gouveia

RECIFE – 2005

Carvalho, André Lacerda Ulysses de
Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14 sob condições
restrita e irrestrita de oxigênio: produção de
compostos bioativos e esporulação / André Lacerda
Ulysses de Carvalho. – Recife : O Autor, 2005.
ix, 57 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2005.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. *Bacillus subtilis* R14 - Fisiologia. 2. Substâncias
Bioativas - Biosurfactantes. 3. Esporulação. I. Título.

616.18
660.6

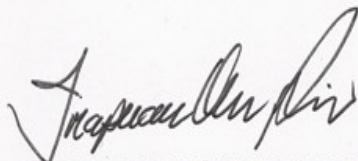
CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-403

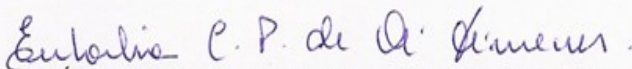
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR ANDRÉ LACERDA
ULYSSES DE CARVALHO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM BIOTECNOLOGIA.

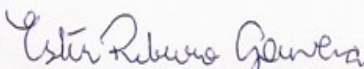
DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 20 DE MAIO DE 2005 DIANTE DA BANCA
EXAMINADORA:



Dr. IRAPUAN OLIVEIRA PINHEIRO
Pesquisador DCR/CNPq



Dra. EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA
Departamento de Antibióticos - UFPE

***“O sonho de uma bactéria,
é tornar-se duas bactérias.”
(F. Jacob)***

AGRADECIMENTOS

A Deus, à força de todas as conquistas de minha vida.

À minha maravilhosa família, fruto do amor de meus queridos pais, aos quais ofereço todas as minhas vitórias.

Às minhas orientadoras, Dra. Ana Maria Souto Maior e Dra. Ester Ribeiro Gouveia, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos: Claudemir dos Santos, Emanuele Pires e Glauciane Damasceno, pela ajuda, companhia e amizade ao longo deste período de mestrado. Ao professor Dr. Irapuan Pinheiro, por sua colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, com carinho à minha amiga e professora, Dra. Maria do Carmo Alves de Lima.

A todos do Departamento de Antibióticos: professores, alunos, e funcionários. Em especial, à secretária do Programa de Pós-Graduação deste departamento, Maria Suely Rodrigues Cavalcanti.

A todos do Laboratório de Análises Clínicas Paulo Loureiro, representado por Dra. Paula Loureiro, onde este ótimo ambiente de convivência, possibilitou-me conciliar a pesquisa com o trabalho. Em especial, às minhas amigas do setor de Microbiologia, à farmacêutica Leda Asfora, e às técnicas Karina Reis, Sandra Vasconcelos e Valquíria Nascimento. Também à farmacêutica Bruna Arruda, do setor de Biologia Molecular.

A todos os amigos que, de perto ou de longe, contribuíram para que as barreiras a serem enfrentadas se tornem sempre menores e mais simples.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
NOMENCLATURA.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Metabolismo Central de <i>Bacillus subtilis</i>	3
2.1.1 Assimilação e catabolismo de glicose.....	3
2.1.2 Metabolismo anaeróbico.....	6
a) Fermentação.....	6
b) Respiração.....	7
2.2 Metabolismo Secundário e Esporulação em <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.2.1 Produção de antibióticos peptídicos.....	8
2.2.2 Esporulação.....	12
2.2.3 Regulação da esporulação e da produção de surfactina.....	14
a) Esporulação.....	14
b) Surfactina.....	16
2.3 Aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> e outros <i>Bacillus</i> na Agricultura.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Microrganismos.....	21
3.2 Meios de Cultura.....	22
3.2.1 Meios de conservação e reativação.....	22
3.2.2 Meio de cultivo.....	22
3.3 Produção de Compostos Bioativos	23
3.3.1 Condições de Cultivo.....	23
3.3.2 Isolamento de Compostos Bioativos.....	25
3.4 Métodos Analíticos.....	25
3.4.1 Atividade antagônica contra fitopatógenos.....	25
3.4.2 Tensão Superficial.....	26
3.4.3 Concentração de biomassa.....	26
3.4.4 Concentração de glicose.....	26
3.4.5 Concentração de sulfato de amônio.....	27
3.4.6 Atividade antimicrobiana.....	28
3.4.7 Concentração de esporos.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Atividade Antagônica de <i>Bacillus subtilis</i> R14 contra Fitopatógenos.....	29

4.2 Investigação sobre a fisiologia de <i>Bacillus subtilis</i> R14.....	31
4.2.1 Fisiologia de <i>Bacillus subtilis</i> R14 sem restrição de oxigênio.....	31
4.2.2 Fisiologia de <i>Bacillus subtilis</i> R14 com restrição de oxigênio.....	35
4.2.2.1 Composto bioativo produzido por <i>Bacillus subtilis</i> R14.....	40
4.2.3 Fisiologia de <i>Bacillus subtilis</i> R14 em anaerobiose.....	43
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICE A	51
APÊNDICE B	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Transporte de glicose em <i>B. subtilis</i> através do sistema fosfotransferase	4
Figura 2.2. Vias metabólicas centrais do carbono em <i>B. subtilis</i>	5
Figura 2.3. Vias fermentativas em <i>B. subtilis</i>	7
Figura 2.4. Estruturas de lipopeptídeos produzidos por algumas espécies de <i>Bacillus</i>	9
Figura 2.5. Mecanismo multienzimático de produção de lipopeptídeos.....	11
Figura 2.6. Esporulação em <i>Bacillus subtilis</i>	13
Figura 2.7. Modulação do circuito de exportação/importação de PhrA que regula a atividade da fosfatase RapA.....	16
Figura 2.8. Regulação da produção de surfactina e esporulação.....	17
Figura 3.1. Biorreator utilizado nos experimentos.....	24
Figura 4.1. Antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> R14 contra (A) <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , (B) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , (C) <i>Erwinia amylovora</i> , (D) <i>Ralstonia solanacearum</i> 13, (E) <i>R. solanacearum</i> 103, (F) <i>Pectobacterium carotovorum</i> , (G) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , (H) <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	29
Figura 4.2. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de <i>B. subtilis</i> R14 em cultivo sem restrição de oxigênio, a 37°C.....	32
Figura 4.3. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de <i>B. subtilis</i> R14 em cultivo sem restrição de oxigênio, a 30°C.....	32
Figura 4.4. Crescimento de <i>B. subtilis</i> R14 em cultivo sem restrição de oxigênio durante a fase exponencial, a 30°C e 37°C.....	34
Figura 4.5. Crescimento, consumo de substratos e atividade antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> R14, em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas sulfato de amônio como fonte de nitrogênio: (A) cultivo I e (B) cultivo II	36
Figura 4.6. Crescimento, consumo de glicose e atividade antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas nitrato de sódio como fonte de nitrogênio: (A) cultivo I e (B) cultivo II.....	38

Figura 4.7. Crescimento, consumo de substratos e produção de composto bioativo de <i>B. subtilis</i> R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio: (A) cultivo I e (B) cultivo II.....	39
Figura 4.8. Cromatografia em camada delgada: (A) surfactina comercial (SIGMA); (B) líquido contendo composto produzido por <i>Bacillus subtilis</i> R14; (C) composto bioativo eluído de cartucho C-18.....	42
Figura 4.9. Atividade contra <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> de: (A) surfactina SIGMA; (B) meio líquido contendo composto bioativo de <i>Bacillus subtilis</i> R14; (C) composto bioativo eluído de cartucho C-18.....	42
Figura 4.10. Crescimento de <i>B. subtilis</i> R14 em tubos de ensaio em aerobiose e anaerobiose.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Microrganismos fitopatógenos testados e doença relacionada.....	22
Tabela 4.1. Atividade antimicrobiana de compostos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> R14 contra alguns microrganismos fitopatógenos.....	30
Tabela 4.2. Tensão superficial do meio líquido, contendo composto bioativo de <i>B. subtilis</i> R14, antes e após extração em cartucho C-18.....	41
Tabela A.1. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de <i>B. subtilis</i> R14 em condição irrestrita de oxigênio, a 37°C.....	52
Tabela A.2. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de <i>B. subtilis</i> R14 em condição irrestrita de oxigênio, a 30°C.....	53
Tabela A.3. Crescimento, consumo de substratos e atividade antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (cultivos I e II).....	54
Tabela A.4. Crescimento, consumo de glicose e atividade antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (cultivos I e II).....	55
Tabela A.5. Crescimento, consumo de substratos e atividade antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> R14 em condições de restrição de oxigênio, utilizando-se nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio (cultivos I e II).....	56

NOMENCLATURA

<i>Gene</i>	<i>Enzima correspondente</i>
<i>ackA</i>	acetatoquinase
<i>alsS</i>	α -acetolactato sintetase
<i>alsD</i>	α -acetolactato descarboxilase
<i>ADH</i>	álcool desidrogenase
<i>ALDH</i>	aldeído desidrogenase
<i>AR</i>	acetoína redutase
<i>cit</i>	citrato sintetase
<i>citB</i>	aconitase
<i>citG</i>	fumarato hidratase
<i>eno</i>	enolase
<i>fbaA</i>	frutose-1,6-bifosfato aldolase
<i>fbp</i>	frutose-1,6-bifosfatase
<i>gap</i>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>gnt</i>	6-fosfogluconato desidrogenase
<i>icd</i>	isocitrato desidrogenase
<i>ldh</i>	lactato desidrogenase
<i>lctP</i>	lactato permease
<i>mdh</i>	malato desidrogenase
<i>odh</i>	2-oxoglutarato desidrogenase
<i>pckA</i>	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<i>pfk</i>	fosfofrutoquinase
<i>pgi</i>	fosfoglicoisomerase
<i>pgk</i>	fosfogliceratoquinase
<i>pgm</i>	fosfogliceratomutase
<i>pta</i>	fosfotransacetilase
<i>ptsG</i>	enzima II (sistema fosfotransferase)
<i>ptsI</i>	enzima I (sistema fosfotransferase)
<i>pycA</i>	piruvato carboxilase
<i>pykA</i>	piruvatoquinase

<i>sdh</i>	succinato desidrogenase
<i>suc</i>	succinil-CoA sintetase
<i>tkt</i>	transketolase
<i>tpi</i>	triose fosfato isomerase
<i>ymjH</i>	transaldolase
<i>ymlF</i>	ribose-5-fosfato isomerase
<i>zwf</i>	glicose-6-fosfato 1-desidrogenase

RESUMO

Várias linhagens de *Bacillus subtilis* produzem lipopeptídeos, que são compostos anfifílicos com atividades antimicrobiana e surfactante. Produção de lipopeptídeos, esporulação e competência em *B. subtilis* estão interligadas através de um arranjo complexo de elementos de controle. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o espectro de ação de *Bacillus subtilis* R14 contra diversos fitopatógenos e identificar condições de cultivo que favorecem a síntese de lipopeptídeos e a esporulação. O antagonismo foi avaliado pelo método de difusão em agar, contra oito fitopatógenos: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão; *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha em coroa; *Erwinia amylovora*, agente causal do fogo bacteriano; *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da podridão mole da batata; *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana da batata e do tomate; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira. Todos os fitopatógenos testados apresentaram inibição em seu crescimento. A fisiologia de *B. subtilis* R14 foi investigada em meios sintéticos, contendo glicose como fonte de carbono/energia e NaNO₃ e/ou NH₄SO₄ como fontes de nitrogênio, sob condições irrestrita e restrita de oxigênio e sob anaerobiose. Crescimento, produção de compostos bioativos e esporulação foram analisados em biorreator descontínuo com um volume de trabalho de 4 litros, com temperatura e pH regulados para 37°C e 7, respectivamente. Em culturas com oxigênio irrestrito, *B. subtilis* R14 esporulou após a glicose ter sido consumida, atingindo uma concentração final de 10⁸ CFU/mL, e não produziu compostos bioativos em nenhuma das fases de crescimento. Em culturas com oxigênio restrito, foi observada a produção de compostos bioativos e não ocorreu esporulação. Nos cultivos em anaerobiose, não foi observado crescimento em nenhum dos meios investigados.

ABSTRACT

Several strains of *Bacillus subtilis* produce lipopeptides, which are amphiphilic compounds with surfactant and antimicrobial activities. Production of lipopeptide, sporulation and competence in *B. subtilis* are interconnected through a complex array of controlling elements. The aims of this study were to evaluate the activity of *B. subtilis* R14 against several phytopathogens and to identify conditions that favor the synthesis of lipopeptides or sporulation. Antagonism was evaluated through agar diffusion method against eight phytopathogenic bacteria. *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*, the causal agent of watermelon fruit blotch; *Agrobacterium tumefaciens*, the causal agent of crown gall; *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight of fruit-trees; *Pectobacterium carotovorum*, the causal agent of soft rot; *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilts tomato and potato; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal agent of black rot of crucifers; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, the causal agent of bacterial canker of grapevine. *B. subtilis* R14 inhibited the growth of all phytopathogens tested. To identify stimuli that favor the synthesis of lipopeptides and sporulation, the physiology of *B. subtilis* R14 was investigated in synthetic medium, containing glucose as carbon source and NH_4SO_4 or NaNO_3 as nitrogen sources, under unrestricted and restricted oxygen availability. Growth, production of bioactive compounds and sporulation were followed during cultivations in a 4-liter working-volume batch bioreactor, at temperature and pH regulated at 37°C and 7, respectively. In excess-oxygen culture, *B. subtilis* R14 did not produce bioactive compounds in detectable amounts in any growth phase and sporulated after glucose depletion, reaching 10^8 CFU/mL. In oxygen-limited culture, sporulation did not occur, but increasing concentration of bioactive compounds was observed during the restricted growth phase. No growth was observed under anaerobiosis.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos no controle de fitopatógenos se constitui em um avanço para a agricultura, como caminho para a substituição ou a redução da prática do uso de pesticidas químicos, uma vez que o uso indiscriminado de agroquímicos induz a resistência de patógenos ao pesticida, polui o meio ambiente e causa danos à saúde humana e animal.

Bacillus spp. possuem várias vantagens em sua utilização como agentes de biocontrole. Têm como características estar presente nos solos, tolerar altas temperaturas e, em particular, formar esporos resistentes. Estes esporos são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, a fertilizantes e ao tempo de estocagem, permitindo, portanto, sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de folhas na forma de “sprays”. Outras vantagens do gênero *Bacillus* são o seu rápido crescimento em meio líquido e a ausência de patogenicidade da maioria das espécies (Shoda, 2000).

A atividade biológica do gênero *Bacillus*, contra diversas bactérias fitopatogênicas e fungos, pode ser atribuída, em grande parte, à produção de antibióticos peptídicos, que possuem um espectro de ação bastante diversificado, contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Mulligan, 2004). Entre estes, o grupo dos lipopeptídeos se destaca como um dos mais eficientes, e representam uma classe de surfactantes microbiológicos com interesses científico, terapêutico e biotecnológico (Leiffert *et al.*, 1995; Backman, *et al.*, 1997; Shoda, 2000).

Estudos realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando-se *Bacillus subtilis* R14, mostraram a atividade antagônica deste microrganismo contra diversas linhagens fitopatogênicas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da Podridão Negra das Crucíferas, e o composto bioativo produzido pela linhagem de *Bacillus* foi parcialmente caracterizado como lipopeptídeo (Luna *et al.*, 2000; Monteiro, 2002). Estudos mais recentes, em colaboração com o Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, demonstram, também, a eficiência de *B. subtilis* R14 no controle da mancha aquosa do melão (*Cucumis melo*), causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Menezes *et al.*, 2003; Santos, 2004). Visando o desenvolvimento futuro de um produto comercial a base de *B. subtilis* R14, os objetivos deste trabalho foram:

- Ampliar o conhecimento sobre o espectro de ação de *B. subtilis* R14, através da avaliação do antagonismo contra diversos fitopatógenos: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão; *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha em coroa em diversas hospedeiras; *Erwinia amylovora*, agente causal da queima da macieira e da pereira; *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da podridão mole em diversas hospedeiras; *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana da batata e do tomate; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira;
- Estudar a fisiologia de *B. subtilis* R14 em biorreator descontínuo, sob condições restrita e irrestrita de oxigênio, visando-se conhecer as condições favoráveis para a produção de compostos bioativos e para a produção de esporos.

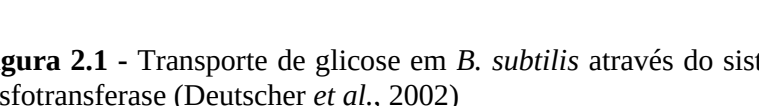
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metabolismo Central de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria facilmente isolada de amostras de solos. Este habitat natural, deste e de outros *Bacillus*, contém uma enorme variedade de carboidratos, incluindo um grande número de polissacarídeos, derivados de plantas, animais e microrganismos. Uma grande diversidade de enzimas degradativas são produzidas por este gênero, permitindo a utilização de mono-, di- e oligossacarídeos, amino açúcares e seus derivados N-acetilados, opinas contendo açúcares, ácidos glicônicos e glicurônicos, e poliálcoois derivados de açúcares (lineares e cíclicos) (Deutscher *et al.*, 2002). Todas estas fontes de carbono são convertidas a intermediários das vias metabólicas centrais do catabolismo de carbono, gerando energia e precursores para reações anabólicas.

2.1.1. Assimilação e catabolismo de glicose

B. subtilis utiliza uma série de sistemas de transporte para assimilação de açúcares (Deutscher *et al.*, 2002). Em particular, o transporte de glicose é realizado através do sistema fosfotransferase (PTS), onde esta é simultaneamente transportada e fosforilada através de um sistema de fosforilação em cadeia, composto por proteínas gerais (EI e HPr) e proteínas específicas para a glicose (EIIA, EIIB e EIIC), como esquematizado na Figura 2.1.



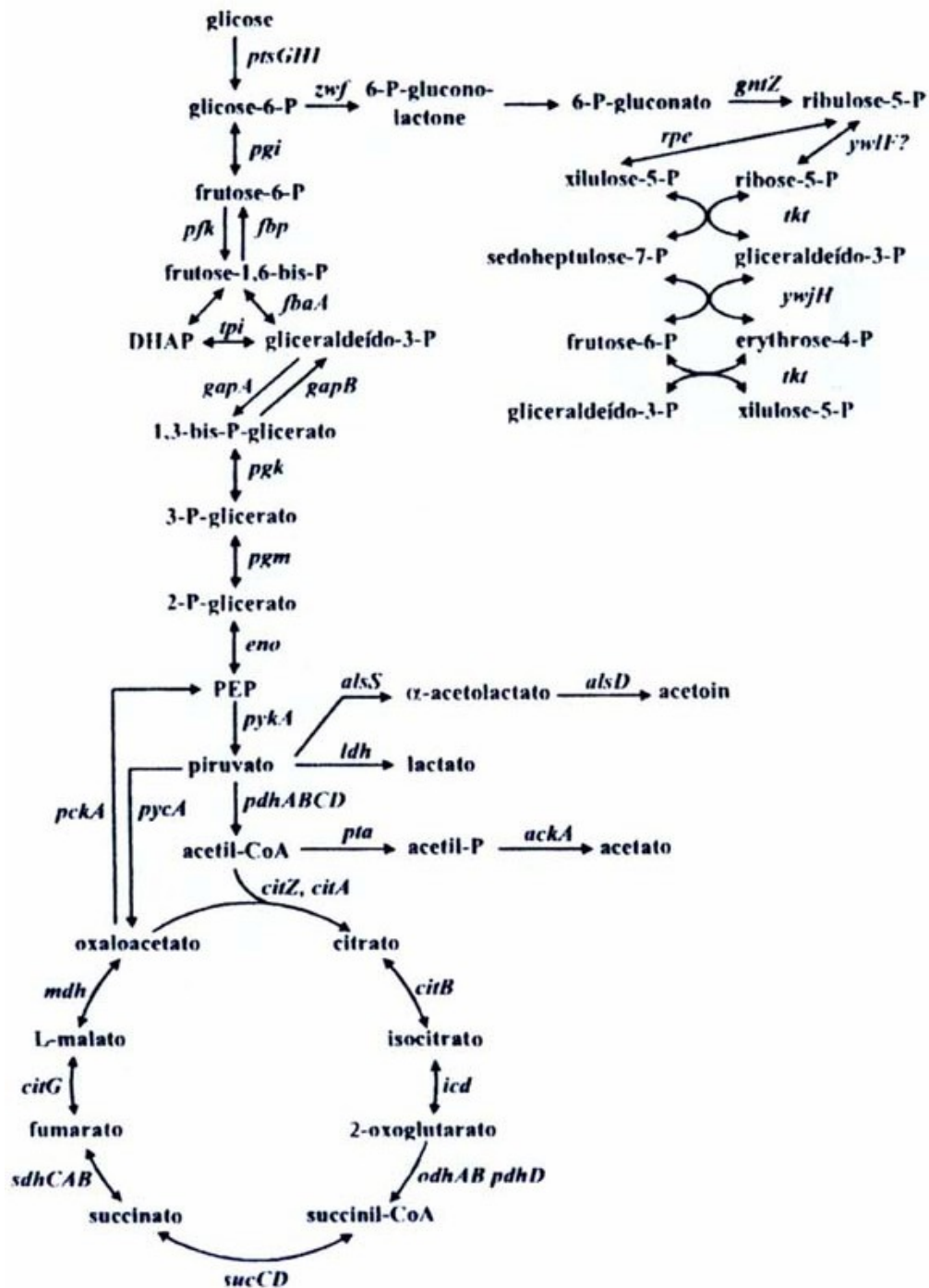


Figura 2.2. Vias metabólicas centrais do carbono em *B. subtilis* (Bencke et al., 2003)

2.1.2. Metabolismo Anaeróbio

B. subtilis foi considerado por muito tempo como estritamente aeróbio, mas estudos mostraram que este também cresce em anaerobiose, utilizando nitrato e nitrito como aceptores finais de elétrons ou por fermentação na ausência deceptor de elétrons. A relação entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio em *B. subtilis* é regulada principalmente no nível da transcrição e em alguns casos, por modulação da atividade enzimática (Nakano & Zuber, 2002).

a) Fermentação

Na fermentação em *B. subtilis*, os produtos identificados, tanto *in vivo* como em meios de cultivo, são etanol, lactato, acetoína, 2,3-butanodiol e acetato. Quando piruvato é adicionado em altas concentrações, a excreção de acetoínas é observada, como também pode ocorrer alta produção de acetato. A chave deste processo é a reoxidação de NADH que é produzido durante a glicólise. A regeneração de NAD^+ é realizada na conversão do piruvato a lactato, e de acetoína e 2,3-butanodiol por descarboxilação do acetolactato, e de etanol e acetato via acetil CoA (Fig. 2.3) (Nakano & Zuber, 2002).

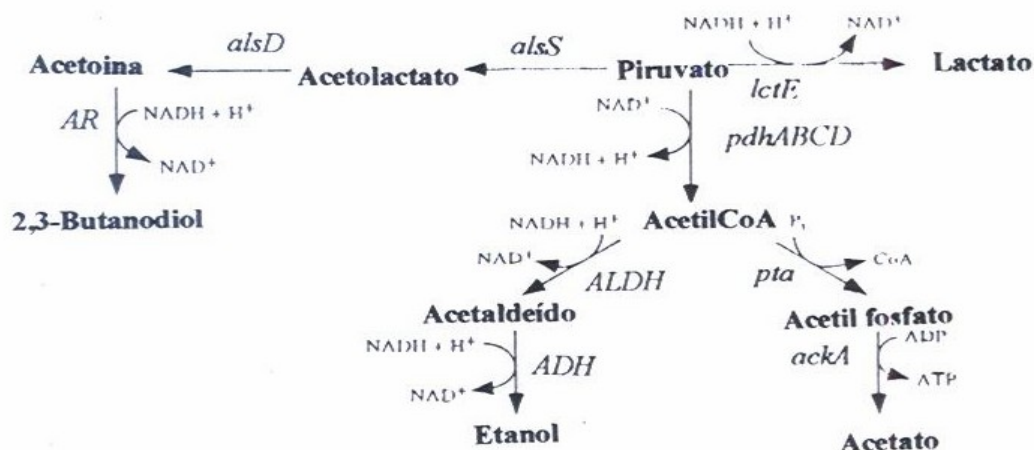


Figura 2.3. Vias fermentativas em *B. subtilis* (Nakano & Zuber, 2002)

b) Respiração

Em anaerobiose, *B. subtilis* utiliza, comoceptor final de elétrons, nitrato ou nitrito. Reduz nitrato gerando ATP por força motriz de prótons. Nitrito reduzido aumenta o crescimento anaeróbico por reoxidação de NADH. Durante a respiração do nitrato, este é reduzido a amônio via nitrito, ocorrendo produção de gases como o óxido nítrico (Nakano & Zuber, 2002).

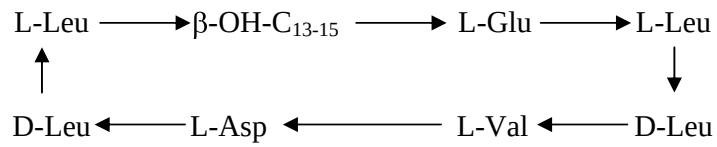
A atividade do ciclo de Krebs tem sido tradicionalmente associada com o metabolismo oxidativo, característico do crescimento aeróbico (Sonenshein, 2002). Em anaerobiose, *B. subtilis*, crescendo em meio mínimo, não expressa as três primeiras enzimas do Ciclo de Krebs, mesmo depois da glicose ter sido consumida (Nakano *et al.*, 1998). Estas três primeiras enzimas são responsáveis pela síntese de glutamato e pela esporulação. O glutamato, em *B. subtilis*, faz parte de sua constituição celular e está em grandes concentrações celulares, cerca de 100 mM por célula (Sonenshein, 2002).

2.2. Metabolismo Secundário e Esporulação em *Bacillus*

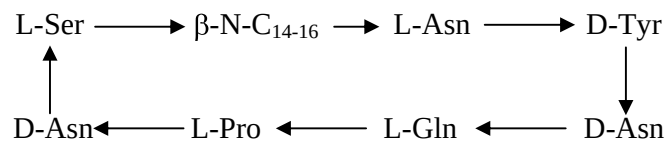
2.2.1. Produção de antibióticos peptídicos

Bacillus spp. são conhecidas por possuir um espectro de ação bastante diversificado, contra bactérias e fungos (Mulligan, 2004). Muitos destes antibióticos produzidos *in vitro* são identificados como antibióticos peptídicos (Leiffert et al., 1995). Os antibióticos peptídicos são compostos de aminoácidos, que apresentam pequena similaridade com outros polipeptídeos, tanto em relação à estrutura como à biossíntese (Marahiel et al., 1993).

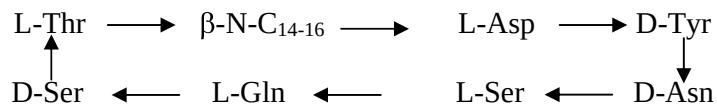
Os lipopeptídeos representam uma classe de surfactantes microbiológicos com interesses científico, terapêutico e biotecnológico (Vater, 1986) (Figura 2.4). Podem atuar como antibióticos, antivirais, agentes antitumorais, imunomoduladores, e inibidores enzimáticos e toxicológicos (Cameotra, 2004). *B. subtilis* produz um lipopeptídeo, denominado surfactina, com excepcional atividade surfactante. Este composto inibe a formação de fibrina, e causa lise eritrocitária e de alguns esferoplastos e protoplastos bacterianos (Cooper et al., 1981). A surfactina produzida por *B. subtilis* tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m em baixas concentrações (Mulligan, 2004).



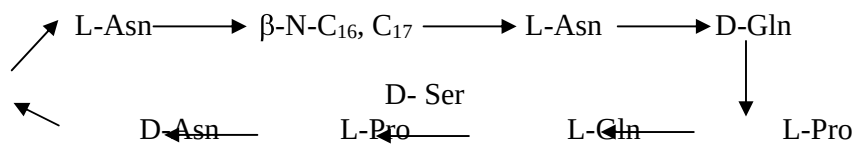
Surfactina



Iturina A



Bacilomicina L



Micosubtilina

Figura 2.4. Estruturas de lipopeptídeos produzidos por algumas espécies de *Bacillus* spp. (Vater, 1986; Zuber & Marahiel, 1997)

Os antibióticos peptídicos podem ser sintetizados por dois mecanismos diferentes, por síntese ribossomal e síntese não ribossomal. Os antibióticos de síntese ribossomal, os lantibióticos, têm sido os mais estudados detalhadamente, em termos de estrutura, síntese e bioquímica. O principal mecanismo de ação é abrir canais da membrana, permitindo o efluxo de íons, metabólitos e solutos (Marahiel et al., 1993).

Os antibióticos de síntese não-ribossomal são representados pela maioria dos lipopeptídeos, que são sintetizados por um mecanismo chamado mecanismo multienzimático ou “thiotemplate” (Marahiel et al., 1993). Nesse mecanismo, os aminoácidos ligados covalentemente estão organizados na ordem de sua adição a cadeia polipeptídica. Eles são ligados entre si por ligações peptídicas, resultando na formação de um peptídeo linear, que por sua vez sofrerá ciclização ou simples remoção através de uma tioesterase (Zuber & Marahiel, 1997) (Figura 2.5).

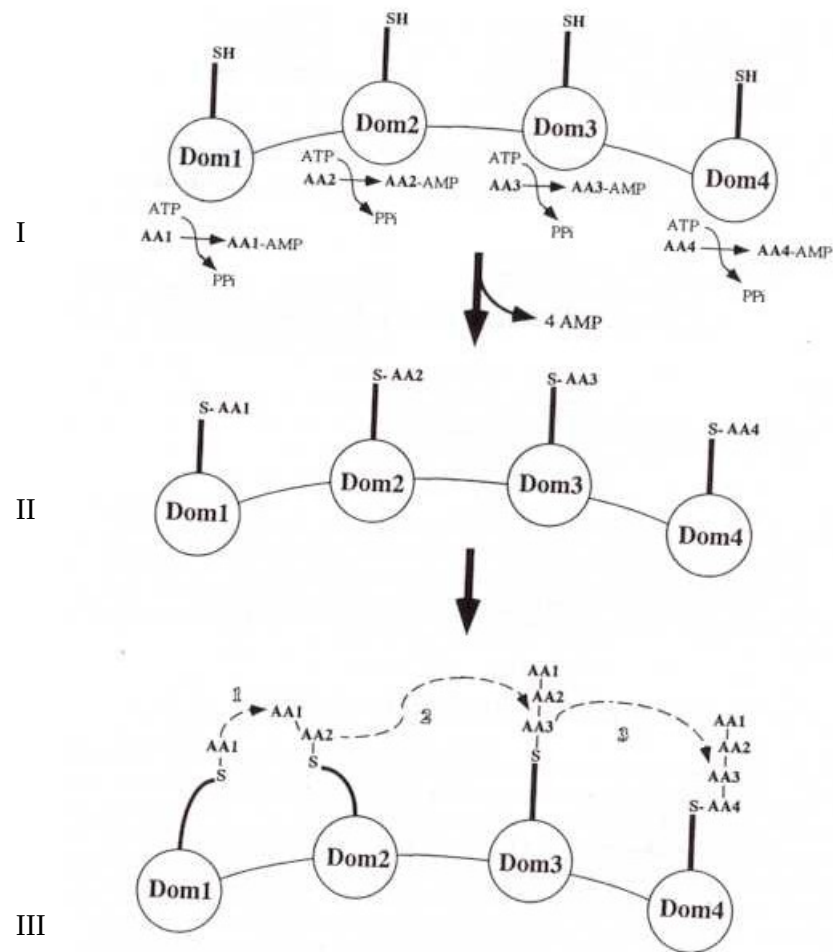


Figura 2.5. Mecanismo multi-enzimático de produção de lipopeptídeos: (I) ativação dos aminoácidos com perda de uma molécula de ATP, formando acil-adenilatos; (II) os acil-adenilatos formam carboxil-tioester a subunidade do complexo com perda do AMP; (III) formação da cadeia polipeptídica através da ligação covalente entre os aminoácidos ligados à molécula de enxofre da subunidade do complexo. Dom = subunidade do complexo enzimático (Zuber & Marahiel, 1997)

2.2.2. Esporulação

Além do crescimento vegetativo, *Bacillus* spp. podem apresentar uma forma de vida alternativo, formando esporos. Condições ambientais pouco adequadas ao crescimento vegetativo, como carência nutricional ou alta densidade celular, associadas a sinais internos relacionados ao metabolismo e ciclo celular, podem induzir este processo.

A estrutura do esporo é completamente diferente da célula vegetativa que lhe deu origem, o que caracteriza um processo de diferenciação celular. Os esporos apresentam uma morfologia e uma composição enzimática e química que lhes conferem resistência a condições hostis ao crescimento vegetativo, como ausência de nutrientes, baixa disponibilidade de água e temperatura elevada. O conteúdo de água diminui de 75-80%, nas células vegetativas, para 15-20% nos esporos, os quais apresentam uma baixa atividade metabólica (dormentes) comparada à das células vegetativas. O esporo é envolvido por uma capa protetora constituída de proteínas, glicoproteínas e peptideoglicanos (Bonato, 2000).

B. subtilis é um bastonete de aproximadamente 3-5 μm de comprimento e 1 μm de largura. Durante o crescimento vegetativo, a bactéria se alonga e ao atingir o dobro do tamanho inicial um septo é formado na posição mediana, dividindo-a em duas células de mesmo tamanho (divisão simétrica). Os dois cromossomos gerados, após a duplicação do DNA, ficam separados pelo septo localizado na posição mediana da célula (Bonato, 2000).

O processo de esporulação resulta numa divisão celular assimétrica, diferindo das divisões celulares simétricas (fissão binária), características do crescimento vegetativo. A

polaridade criada pela divisão assimétrica não parece existir antes da formação do septo, e é reforçada tanto pela migração de proteínas específicas em direção ao septo e outros sítios do pré-esporo e da célula-mãe, como pela expressão gênica diferencial nos dois compartimentos. Após septação, a célula mãe engloba o pré-esporo, mantendo-o envolvido (endosporo) até seu amadurecimento. Esta estrutura é denominada esporângio e tem cerca de 1,8 μm de comprimento (Piggot, 1996; Errington, 1996). Finalmente, a célula-mãe é lisada liberando o esporo maduro, uma célula altamente resistente. Assim que as condições ambientais se tornarem adequadas, o esporo sairá da dormência e assumirá o crescimento vegetativo, repetindo-se o ciclo (Figura 2.6).

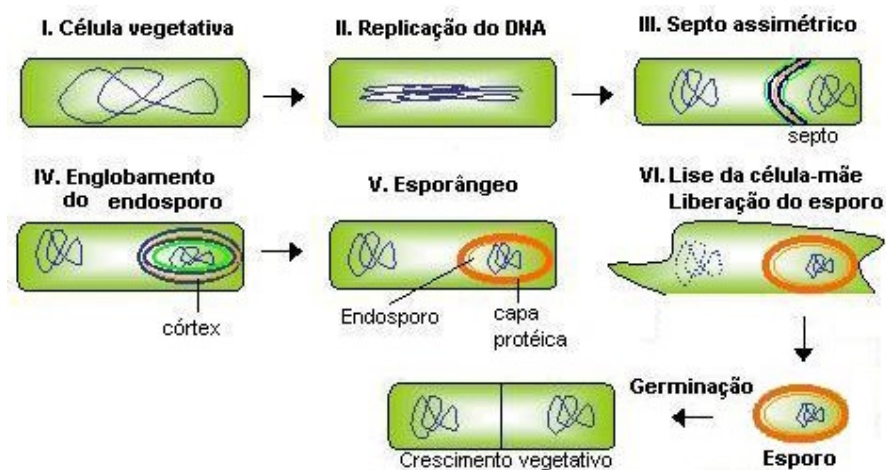


Figura 2.6. Esporulação em *Bacillus subtilis* (Bonato, 2000)

2.2.3. Regulação da esporulação e da produção de surfactina

a) Esporulação

Vários são os fatores que podem afetar a esporulação em *B. subtilis*, entre estes, interferências no ciclo de Krebs, condições de anaerobiose e concentrações de substâncias diversas no meio.

Todas as mutações de inativação em genes do ciclo de Krebs em *B. subtilis* causam defeito na esporulação. Em grande parte, estes defeitos podem ser atribuídos a funções de metabólitos essenciais que afetam as enzimas. Defeito na esporulação pode ser atribuído ao acúmulo de citrato, ambos dentro da célula e no meio. O citrato atua como quelante de cátions divalentes, neste caso, Mn^{2+} e Fe^{2+} são os cátions relevantes. Os cátions Mn^{2+} e Fe^{2+} são importantes, pois funcionam como ativadores de Spo0A, que é a proteína chave da esporulação (Sonenshein, 2002).

B. subtilis não esporula eficientemente em condições de anaerobiose. A deficiência de compostos em seu metabolismo faz com que não sejam expressas as três primeiras enzimas do ciclo de Krebs que comprometem a eficiência de Spo0A (Nakano *et al.*, 1998). O processo de esporulação funciona como um circuito de integração de sinais, permitindo que diferentes sinais, positivos ou negativos, influam na decisão de desenvolvimento da célula, via competição entre quinases e fosfatases. Assim, é num breve momento, entre a última divisão celular e o próximo ciclo de síntese de DNA, que a célula, monitorando o meio externo e as

condições metabólicas internas, decide se vai continuar seu crescimento vegetativo ou iniciar a esporulação (Nakano & Zuber, 2002).

Um mecanismo proposto para controle desta esporulação é através de fosfatases, RapA e RapB, que desfosforilam Spo0A, funcionando como reguladores intermediários (Figura 2.7). Estas fosfatases seriam controladas pelo peptídeo PhrA. A fosfatase RapA e o peptídeo PhrA são codificados no mesmo operon, *rapA*. A transcrição deste operon é controlada positivamente pelo fator de transcrição ComA~P, cuja função é relacionada à indução do estado de competência da célula bacteriana. ComA~P, ao induzir o operon *rapA* impede a esporulação, uma vez que a fosfatase RapA é um inibidor de esporulação. Por outro lado, a atividade da fosfatase é modulada pelo peptídeo PhrA (Perego,1997).

PhrA inibe a ação da fosfatase RapA ligando-se a ela e tornando-a inativa, favorecendo, portanto, a esporulação. Todavia, PhrA só age como inibidor da fosfatase na forma de um pentapeptídeo e, para tanto, precisa sofrer processamento proteolítico, uma vez que é sintetizado como uma proteína de 44 resíduos de aminoácidos (pré-inibidor). Para ser processado, o pré-inibidor precisa ser exportado e somente será reimportado na forma de pentapeptídeo. O pré-inibidor PhrA apresenta uma sequência sinal e um sítio consenso de peptidase no terminal amino (N-terminal), seguidos de 19-20 resíduos no terminal carboxila (C-terminal). Após clivagem, o segmento C-terminal (pró-inibidor) se localiza na superfície externa da membrana. Uma segunda clivagem proteolítica, já na superfície externa, deve ocorrer para produzir o inibidor ativo (pentapeptídeo).

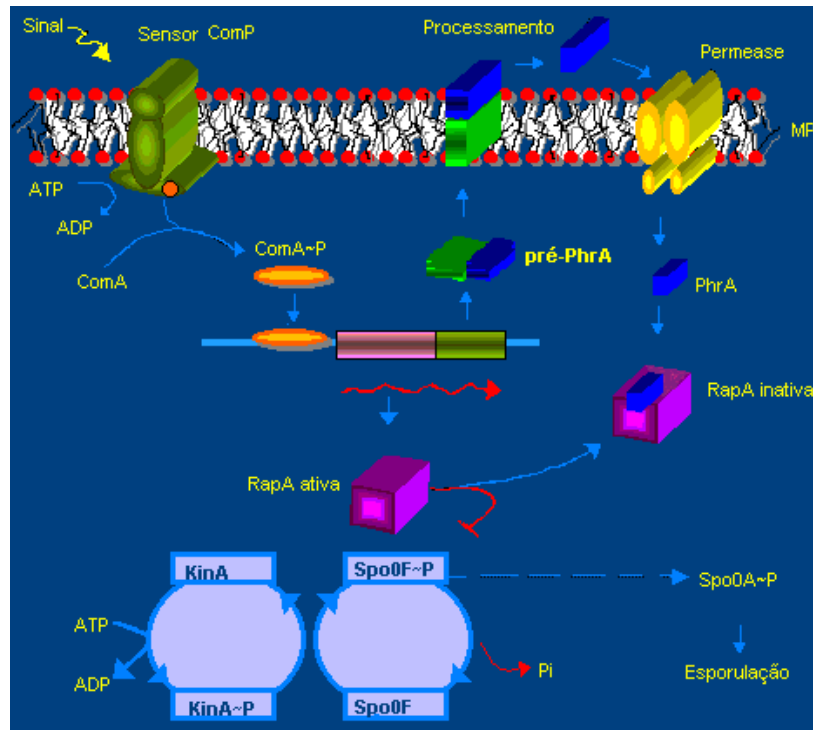


Figura 2.7. Modulação do circuito de exportação/importação de PhrA que regula a atividade da fosfatase RapA. Quando RapA está ativa, desfosforila Spo0F bloqueando a esporulação. PhrA, por sua vez, desativa RapA propiciando a esporulação. A transcrição do operon RapA/PhrA é modulada pelo fator de transcrição ComA~P (Perego,1997)

b) Surfactina

O caminho da síntese da surfactina é, também, dependente da forma fosforilada de ComA, que é o regulador principal de sua produção, assim como na esporulação, que funciona como um ativador de transcrição (Figura 2.8). ComA fosforilado está relacionado à indução do estado de competência da célula bacteriana. A proteína SpoA na sua forma desfosforilada é responsável pela síntese do Fator Estimulador de Competência (CSF), fator este que vai estimular a fosforilação de ComA. Então, SpoA, tanto pode funcionar como uma proteína reguladora de genes responsáveis pela esporulação, como pela síntese de CSF. Outro

responsável pelo estado de competência celular é um feromônio oligopeptídico extracelular, que, juntamente com o CSF, irá estimular a fosforilação de ComA. ComA fosforilada se liga à molécula de RNA, ocorrendo a expressão de genes de competência e de síntese de surfactina (Chater & Bibb, 1997).

Segundo Bonato (2000), os processos de esporulação e competência são excludentes, ou seja, não ocorrerem simultaneamente na mesma célula.

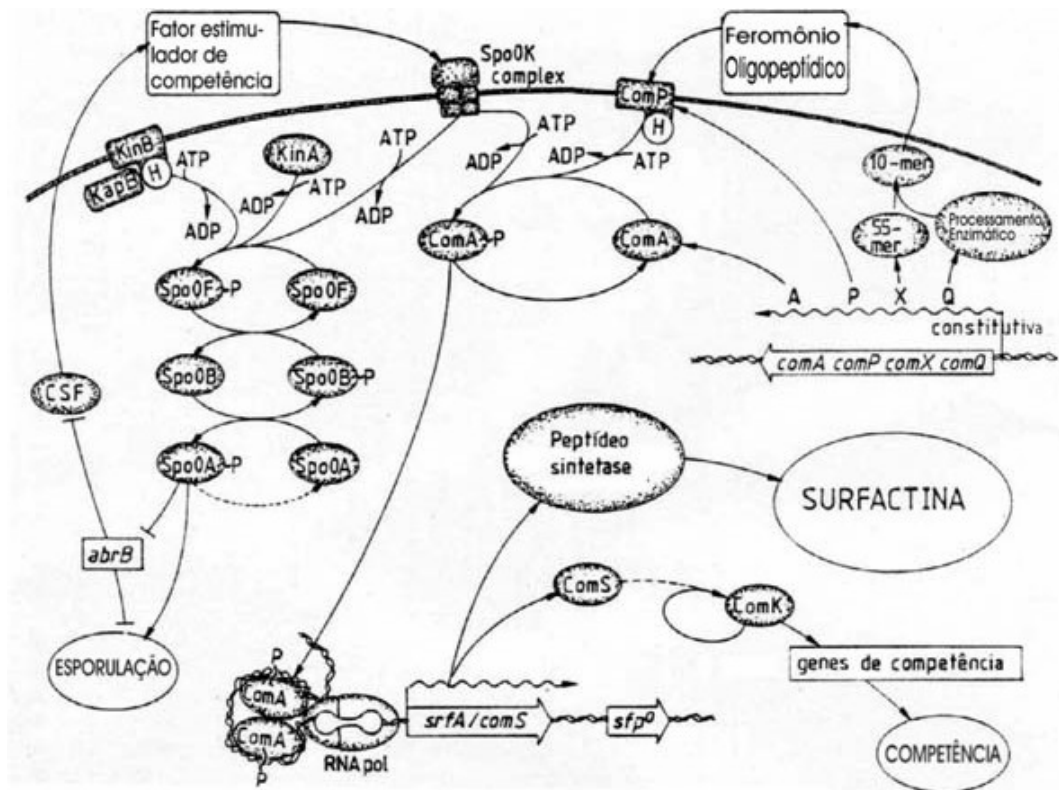


Figura 2.8. Regulação da produção de surfactina e esporulação (Chater & Bibb, 1997)

2.3 Aplicação de *Bacillus subtilis* e outros *Bacillus* na Agricultura

A exploração da Biotecnologia Microbiana na agricultura é o caminho para substituir práticas que são de alto custo e reduzir o uso de pesticidas químicos. O uso indiscriminado de agroquímicos contribui com a degradação do ecossistema e induz a resistência de patógenos a pesticidas, causando problemas de morte animal e humana (Luna *et al.*, 2002).

Diferentes mecanismos estão envolvidos na ação destes microrganismos utilizados contra patógenos de plantas, como o parasitismo, a proteção cruzada, a antibiose e a competição. Quando o mecanismo é parasitismo, um organismo, o parasita, vive em associação íntima e total dependência de um outro, chamado de hospedeiro. Na antibiose, o produto metabólico de um microrganismo inibe ou suprime o crescimento de espécies patogênicas. No mecanismo por competição, duas espécies competem por nutrientes ou pelo espaço. Na proteção cruzada, uma célula é infectada por um patógeno atenuado, diminuindo a possibilidade de infecção por outro patógeno, através da “imunização” (Shoda, 2000).

B. subtilis é um dos mais eficientes agentes de biocontrole, apresentando atividade biológica contra diversas bactérias e fungos fitopatogênicos. O seu potencial como biocontrolador é alto por apresentar como características estar presente nos solos, tolerar altas temperaturas, rápido crescimento em culturas líquidas, formação de esporos resistentes, e serem considerados agentes de proteção biológica seguros (Shoda, 2000).

O interesse pela utilização de *B. subtilis*, na promoção de crescimento e como agente de biocontrole, começou nos anos 50, quando foi observado maior crescimento de plantas em cujas rizosferas foram aplicadas linhagens desse gênero. Posteriormente, demonstrou-se que esses microrganismos também podem ser utilizados na superfície de folhas para controle biológico. Esse gênero já demonstrou grande vantagem por ser de fácil formulação e por ter capacidade de colonizar múltiplas espécies de plantas (Backman *et al.*,1997).

Diversos trabalhos foram publicados e constataram a utilidade desse microrganismo no controle de doenças de plantas. Como exemplos, temos o controle de doenças em plantações de feijão e de cebola (Backman *et al.*,1997), de *Erwinia amylovora*, agente da queima das rosáceas (Abo-el-dahab & El-goorami, 1964), de *Uromyces phaseoli*, causador da ferrugem do feijoeiro (Baker & Stavely, 1985), de *Rhizoctonia solani*, agente da queima-da-bainha, de *Pythium* spp., agente da podridão do colo, de *Fusarium* spp., causador do apodrecimento de sementes, e de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente da podridão negra das crucíferas (Pusey, 1989; Melo, 1998).

Lazzaretti e Bettiol (1997) relataram que a utilização de pó molhável à base dessa bactéria demonstrou uma atividade semelhante ao fungicida benomil no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus* sp. e *Rhizoctonia solani*, quando aplicado em sementes de feijão. De forma semelhante, Asaka e Shoda (1996) constataram que o caldo fermentado de *B. subtilis* RB14-C, centrifugado ou não, diminuiu a percentagem de plantas infectadas por *R. solani*, causador do tombamento de plântulas de tomateiro. Vários outros produtos a base de *Bacillus* spp. já são comercializados, especialmente na China, para aumento de

produtividade, relatado em torno de 10-22%, e controle microbiológico em culturas de hortaliças, arroz, algodão, nabo e trigo (Luz, 1996).

Estudos desenvolvidos no Departamento de Antibióticos (UFPE) com *B. subtilis*, R14 demonstraram a produção de metabólitos ativos contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas (Luna *et al.*, 2000; Monteiro, 2002; Monteiro *et al.*, 2005), e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão (*Cucumis melo*) (Menezes *et al.*, 2003). Testes *in vivo*, em casa de vegetação, também demonstraram resultados positivos contra a mancha aquosa do melão (Menezes *et al.*, 2003; Santos, 2004). Os compostos produzidos por *B. subtilis* R14 foram parcialmente caracterizados como lipopeptídeos (Monteiro, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Bacillus subtilis R14, isolado de repolho, fornecido pelo Laboratório de Fitobacteriologia da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), foi o microrganismo utilizado para o desenvolvimento deste trabalho. Para os testes de atividade dos produtos produzidos por *B. subtilis* R14, foram utilizadas oito linhagens de microrganismos fitopatógenos, fornecidas pelo mesmo Laboratório da UFRPE e pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. A Tabela 3.1 apresenta a relação dos microrganismos fitopatógenos utilizados e as doenças a eles relacionadas.

Tabela 3.1. Microrganismos fitopatógenos e doenças relacionadas

<i>Microrganismo</i>	<i>Doença</i>
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Mancha aquosa do melão
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Galha em coroa em diversas hortaliças
<i>Erwinia amylovora</i>	Queima da macieira e da pereira
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Podridão mole em diversas frutíferas
<i>Ralstonia solanacearum</i> 13	Murcha bacteriana da batata
<i>Ralstonia solanacearum</i> 103	Murcha bacteriana do tomate
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Podridão negra das crucíferas
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	Cancro bacteriano da videira

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meios de conservação e reativação

O meio Agar Nutriente (AN), foi utilizado em tubos inclinados para a manutenção da cultura de *B. subtilis* R14. Sua composição é (em g/L): extrato de carne (3); peptona de carne (10); NaCl (5); Ágar (20); pH 7,0.

O meio Caldo Nutriente (CN), foi utilizado para realizar a reativação de *B. subtilis*. Esse meio apresenta a seguinte composição (em g/L): Extrato de carne (3); Peptona de carne (10); NaCl (5); pH 7,0.

O meio ágar dextrose levedura nutriente (NYDA) foi utilizado em tubos inclinados para a manutenção das culturas dos fitopatógenos e para realização dos testes de atividade antimicrobiana. Sua composição é (em g/L): extrato de levedura (3); glicose (10); ágar (23); pH 7,0. Para reativação destes microrganismos foi utilizado o meio dextrose levedura nutriente (NYD), mesma composição do meio NYDA, sem ágar.

3.2.2 Meio de cultivo

Para realização dos cultivos em biorreator, foi utilizado um meio de cultura sintético com variações nas concentrações de glicose, nitrato de sódio e sulfato de amônio, dependendo do cultivo ter sido realizado em aerobiose, com restrição de oxigênio ou em anaerobiose.

Em aerobiose, foi utilizado meio de cultura contendo (em g/L): glicose (10); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2); K_2HPO_4 (13,6); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); solução de elementos traços (10 mL/L), composta de (em g/L): CaCl_2 (0,42); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,29); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,10); ZnCl_2 (0,17); CuCl_2 (0,03); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,06); e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,06); pH 7,0.

Em anaerobiose e em restrição de oxigênio, foram realizados cultivos em meio contendo (em g/L): glicose (40) ; K_2HPO_4 (13,6); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); solução de elementos traços (10 mL/L); pH 7,0. Com variações nas fontes de nitrogênio desse meio de cultura, variando (em g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8); ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4) e NaNO_3 (4); ou NaNO_3 (8).

3.3 Produção de Substâncias Bioativas

3.3.1 Condições de cultivo

Cultura de *B. subtilis* R14 foi repicada em meio AN, cultivada por 24 horas a 37°C, e, em seguida, repicada em meio CN. Após 24 horas, a 37°C e 250 rpm, 5% v/v foi transferido para o meio de cultivo em frascos Fernbach de 3000 mL, contendo 200 mL do meio de cultivo. Os frascos Fernbach foram acondicionados em mesa agitadora (New Brunswick; modelo C25KC), a 30/37°C e 250 rpm, por 12 horas e, em seguida, transferido para o biorreator (New Brunswick Scientific; modelo BiofloIII) (Figura 3.1), completando um volume total de 4 L, a 37°C e a 30°C. Para condições de aerobiose, foi utilizada aeração de 1 vvm e agitação de 700 rpm. Em limitação de oxigênio foi utilizada agitação

de 300 rpm ou de 150 rpm e foi sem aeração. O pH controlado em 7,0 durante todos os cultivos.



Figura 3.1- Biorreator utilizado nos experimentos (New Brunswick Scientific; modelo BiofloIII)

Os cultivos em anaerobiose foram realizados em jaras de Gaspak de 2,5 L, utilizando-se um gerador de atmosfera anaeróbia por aumento de gás carbônico, obtida através de reação de óxido-redução. Cultura de *Bacillus subtilis* R14 foi repicada em meio AN, cultivada por 24 horas a 37°C, e, em seguida, repicada em meio CN. Após 24 horas, a

37°C e 250 rpm, 10% v/v foi transferido para o meio de cultivo em tubos e incubados em jarra de Gaspak, a 37°C, por um período de 72 horas.

3.3.2 Isolamento de compostos bioativos

Amostra de cultivo de *B. subtilis* R14, com atividade biológica, foi filtrada em membranas Millipore com porosidade de 0,22 µm, e submetida a uma extração em fase sólida em cartucho C-18 (500 mg/3 mL), para se isolar lipopeptídeos da amostra. O cartucho foi ativado com 6 mL de metanol e 3 mL de água destilada. Foram utilizados 21 mL de amostra, e o produto extraído foi eluído com 21 mL de metanol. Em seguida, foi realizada uma cromatografia em camada fina para caracterização do produto, utilizando-se o sistema metanol–clorofórmio (6:4) e revelação com vapor de iodo.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Atividade antagônica contra fitopatógenos

A atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14 contra fitopatógenos foi determinada pelo método de difusão em meio sólido. Uma suspensão do fitopatógeno a ser testado, cultivado em meio NYDA por 24 horas, foi preparada com água destilada esterilizada, com uma concentração celular equivalente ao padrão número 1 da escala de McFarland (em torno de

10^9 células/mL). Foi colocado 1,0 mL dessa suspensão junto com 9,0 mL de meio NYDA, a uma temperatura em torno de 40°C, em placas estéreis, medindo 90 mm de diâmetro por 15 mm de altura, homogeneizando adequadamente. Discos de papel foram embebidos com 20 µL de líquido fermentado por *B. subtilis* R14, contendo compostos bioativos, e colocados sobre placa contendo meio específico para crescimento do fitopatógeno. A leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada após 24 horas de incubação a 30°C. Os resultados foram expressos como atividade antimicrobiana (mm).

3.4.2 Tensão superficial

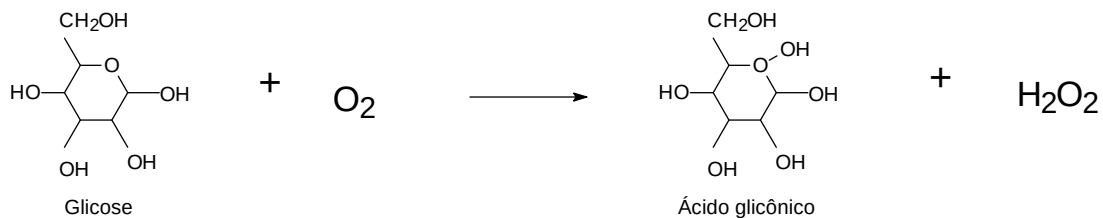
Foi medida a tensão superficial da amostra, antes e após extração em cartucho C-18. Amostras centrifugadas de 20 mL foram analisadas utilizando um tensiômetro CSC (Dunouy Interfacial Tensiometer).

3.4.3 Concentração de biomassa

A quantificação da concentração de biomassa foi realizada por densidade ótica, utilizando-se um espectrofotômetro a 600 nm (Hewlett Packard; UV/VIS modelo 8453).

3.4.4 Concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose foi realizada utilizando-se um método colorimétrico com kit Bioclin. Nesse teste, a glicose é oxidada pela ação da glicose-oxidase, de acordo com a reação:

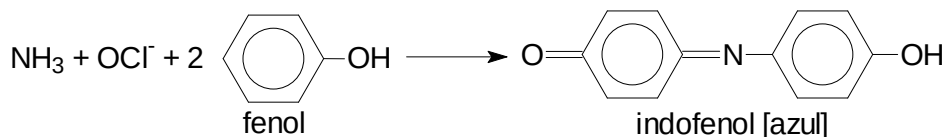


O peróxido de hidrogênio formado reage, em presença de oxidase, com a 4-aminoantipirina e fenol, através de um acoplamento oxidativo, formando um cromógeno vermelho cereja, cuja intensidade da cor, proporcional à concentração de glicose, é medida espectrofotometricamente a 500 nm.

3.4.5 Concentração de sulfato de amônio

A análise da concentração do sulfato de amônio foi realizada através de método colorimétrico quantitativo, com “kit” comercial Urease/Berthelot-Kit (Sigma nº 640).

A amônia presente no meio reage com hipoclorito de sódio e fenol (reação de Berthelot), em presença de um catalisador (nitroferrocianeto de sódio) e transforma em indofenol (azul). A concentração de amônia produzida, que é diretamente proporcional ao indofenol produzido, é medida espectrofotometricamente a 570 nm.



3.4.6 Atividade antimicrobiana

A produção de compostos bioativos foi acompanhada ao longo do cultivo através de teste de atividade antimicrobiana, realizado com o líquido obtido após filtração das amostras. Esta filtração das células foi realizada em filtros Millex-FG (Millipore), com porosidade 0,22 μm .

A metodologia utilizada foi a de difusão em meio sólido. Discos de papel previamente esterilizados foram saturados com 20 μL das amostras filtradas e colocados sobre a placa contendo o NYDA, junto com uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*, equivalente ao padrão número 1 da escala de McFarland (em torno de 10^9 células/mL).

A leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada após 24 horas de incubação a 30° C. Os resultados foram expressos como atividade antimicrobiana (mm).

3.4.7 Concentração de esporos

Após um choque térmico de 80°C por 15 minutos, foram realizadas diluições sucessivas das amostras originais e aplicados 10 μL destas suspensões em placas de Petri contendo meio AN. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e as colônias contadas e expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade Antagônica de *Bacillus subtilis* R14 contra fitopatógenos

A atividade antagônica de *B. subtilis* R14 foi avaliada contra oito bactérias fitopatógenas, conforme descrito no item 3.4.1. A Figura 4.1 apresenta os resultados do antagonismo de *B. subtilis* R14 contra: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão, *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha em coroa em diversas hospedeiras, *Erwinia amylovora*, agente causal da queima da macieira e da pereira, *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da podridão mole em diversas hospedeiras, *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana da batata e do tomate, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira. Todos os fitopatógenos apresentaram sensibilidade, em especial *Agrobacterium tumefaciens*, aos produtos produzidos por *B. subtilis* R14. Na Tabela 4.1, encontram-se os diâmetros dos halos formados no teste de atividade.

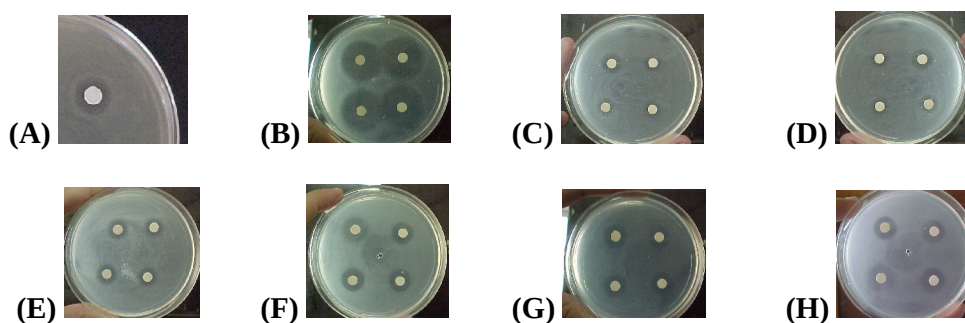


Figura 4.1 - Antagonismo de *Bacillus subtilis* R14 contra: (A) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; (B) *Agrobacterium tumefaciens*; (C) *Erwinia amylovora*; (D) *Ralstonia solanacearum* 13; (E) *R. solanacearum* 103; (F) *Pectobacterium carotovorum*; (G) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; (H) *X. campestris* pv. *viticola*

Tabela 4.1. Atividade antimicrobiana de compostos produzidos por *Bacillus subtilis* R14 contra alguns microrganismos fitopatógenos

Microrganismo	Halo (mm)*
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	12,1 ± 0,2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26,3 ± 0,1
<i>Erwinia amylovora</i>	11,8 ± 0,2
<i>Ralstonia solanacearum</i> 13	11,0 ± 0,1
<i>R. solanacearum</i> 103	15,8 ± 0,1
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	15,9 ± 0,1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	13,6 ± 0,2
<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	14,5 ± 0,2

* média de 4 repetições

Os resultados obtidos confirmam o potencial de *Bacillus subtilis* R14 como agente biocontrolador de bactérias fitopatógenas. Experimentos *in vivo* já haviam demonstrado a ação desta linhagem na redução da incidência da podridão negra das crucíferas e da mancha-aquosa do melão (Assis *et al.*, 1996, 1997; Santos, 2004). O amplo espectro de ação *in vitro* indica que a linhagem poderá atuar como controlador de diversas doenças de interesse, considerando-se que o mecanismo de antibiose tenha papel preponderante neste controle.

4.2 Investigação sobre a fisiologia de *Bacillus subtilis* R14

A produção de metabólitos secundários está normalmente associada a uma resposta do microrganismo a um ambiente que limita seu crescimento. Em face à exaustão de nutrientes essenciais, *B. subtilis* pode adotar várias respostas, incluindo mobilidade, excreção de enzimas extracelulares, competência para transformação genética, produção de antibióticos e, finalmente, esporulação. Dependendo do sinal do ambiente, um ou mais desses processos alternativos podem ser estimulados ou inibidos (Smith, 1993). Nesta etapa do trabalho, a fisiologia de *B. subtilis* R14 foi investigada em cultivos descontínuos, sob condições restrita e irrestrita de oxigênio, para identificar condições favoráveis à produção de compostos bioativos e esporulação.

4.2.1 FISILOGIA DE *BACILLUS SUBTILIS* R14 SEM RESTRIÇÃO DE OXIGÊNIO

Como descrito no item 3.2, foram realizados cultivos descontínuos, com agitação e aeração, utilizando-se meio de cultura com glicose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Neste caso, foram realizados experimentos a 30°C e a 37°C, para se comparar as velocidades específicas de crescimento do microrganismo durante a fase exponencial de crescimento. A Figura 4.2 e a Tabela A.1 apresentam os resultados obtidos para o crescimento, consumo de substratos e produção de composto bioativo, para o cultivo realizado a 37°C. A Figura 4.3 e a Tabela A.2 mostram os resultados para o cultivo a 30°C.

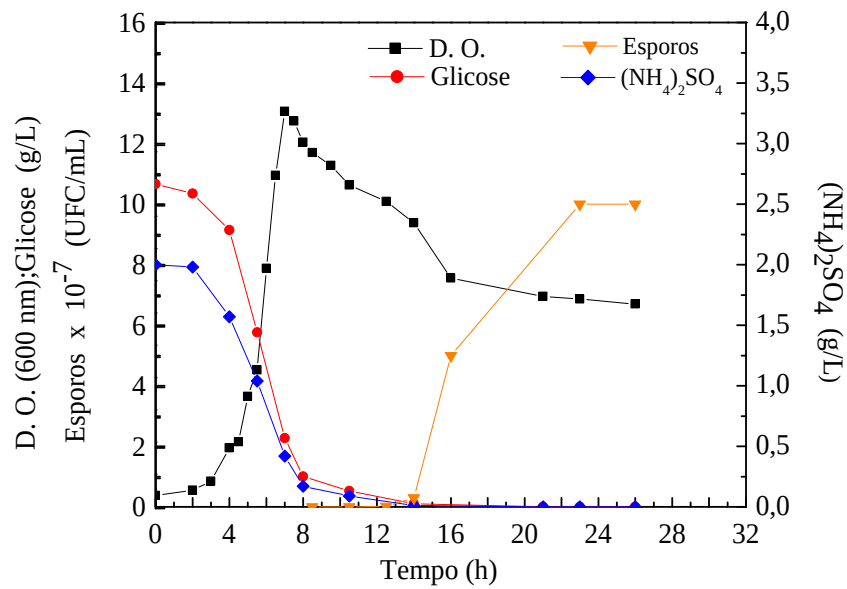


Figura 4.2. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de *B. subtilis* R14 em cultivo sem restrição de oxigênio, a 37°C

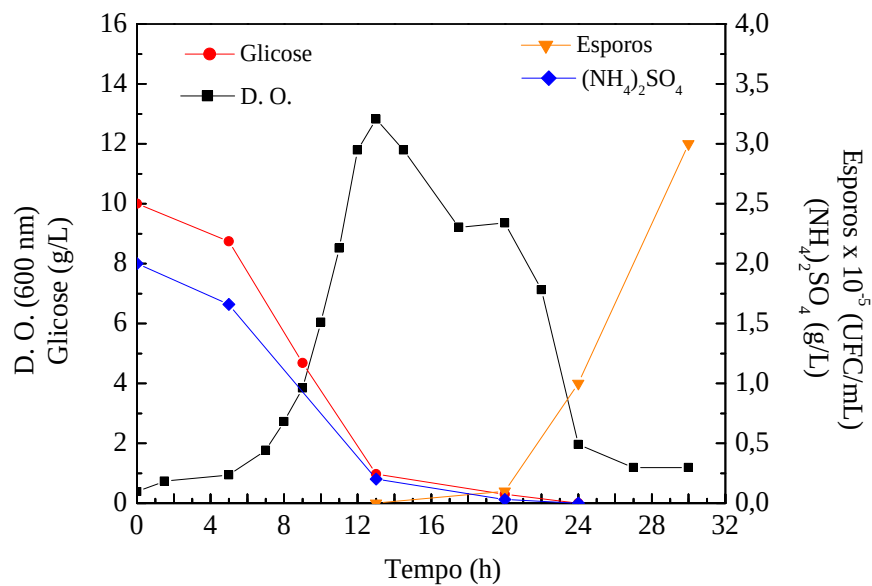


Figura 4.3. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de *B. subtilis* R14 em cultivo sem restrição de oxigênio, a 30°C

Cultivos sob condição irrestrita de oxigênio mostraram-se adequados ao crescimento celular e à esporulação. Em cultivo a 37°C, durante a fase exponencial de crescimento, *B. subtilis* R14 cresceu com uma velocidade duas vezes maior que em cultivo a 30°C, como apresentado na Figura 4.4. As velocidades específicas máxima de crescimento, calculadas através dos valores das inclinações das retas, foram 0,81 h⁻¹ e 0,39 h⁻¹, para 37°C e 30°C, respectivamente. Embora a biomassa máxima tenha sido atingida em tempos diferentes, o rendimento em biomassa não foi afetado pela diferença de temperaturas e as concentrações foram semelhante para 37°C e 30°C.

Em ambos os casos, a formação de esporos ocorreu em resposta à exaustão de glicose. No cultivo a 37°C, a concentração de esporos já havia atingido um valor máximo, em torno de 10⁸ UFC/mL, em 24 horas. No cultivo a 30°C, como o crescimento foi mais lento, em 24 horas, a concentração de esporos ainda era de aproximadamente 10⁵ UFC/mL. A temperatura de 37°C mostrou-se, portanto, melhor, tanto para a produtividade em biomassa quanto para a produtividade em esporos.

A condição irrestrita de oxigênio foi favorável para um rápido crescimento e subsequente formação de esporos, mas não para a produção de compostos bioativos. Foi realizado teste de atividade de amostras de todos os cultivos, e nenhum apresentou atividade. Devido às características do meio de cultivo, contendo fontes de C e N de rápida assimilação e relação C/N balanceada, a transição entre a fase exponencial e a fase estacionária foi rápida, de forma que a formação de metabólitos secundários foi desfavorecida. Por outro lado, a formação de esporos foi favorecida pela rápida exaustão de nutrientes e pela disponibilidade

de oxigênio, já que um dos fatores que favorecem a esporulação é o perfeito funcionamento de todas as vias do ciclo de Krebs (Soneshein, 2002).

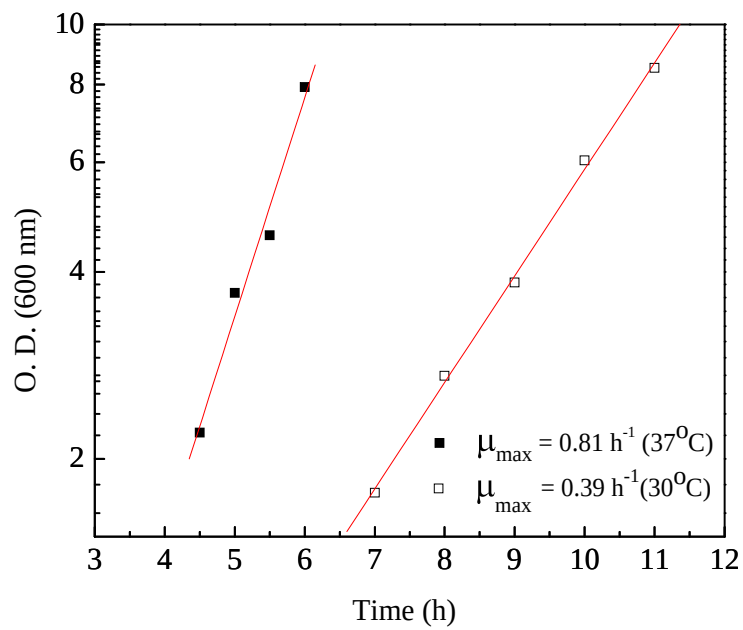
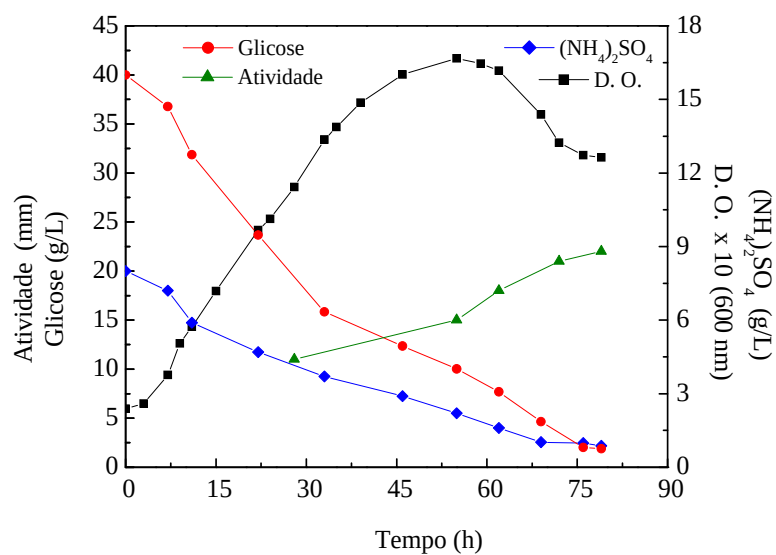


Figura 4.4. Crescimento de *B. subtilis* R14 em cultivo sem restrição de oxigênio durante a fase exponencial, a 30°C e 37°C

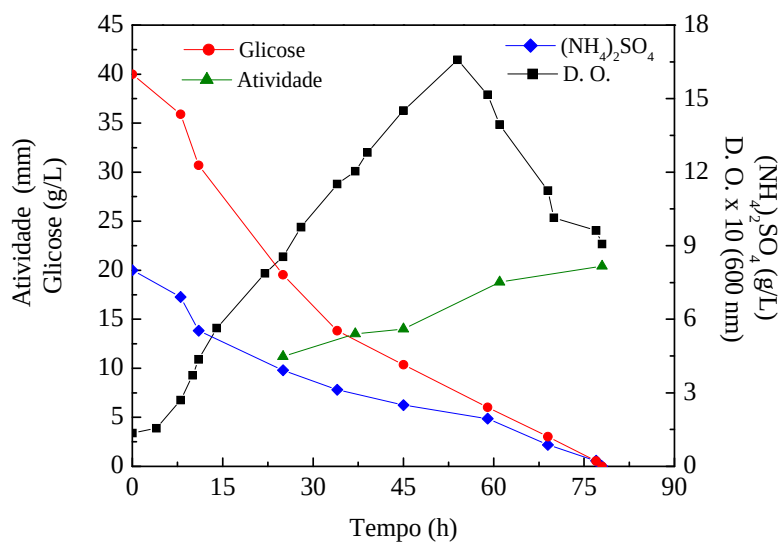
4.2.2 FISILOGIA DE *BACILLUS SUBTILIS* R14 COM RESTRIÇÃO DE OXIGÊNIO

Nesta etapa do trabalho, foi investigada a influência da limitação de oxigênio, em presença de excesso de nutrientes essenciais, na formação de compostos bioativos por *B. subtilis* R14. Para se restringir a disponibilidade de oxigênio, foram realizados cultivos descontínuos sem aeração e com agitação baixa. Neste caso, foram realizados cultivos com glicose e três fontes alternativas de nitrogênio: sulfato de amônio, nitrato de sódio, e nitrato com amônio. A utilização de nitrato foi motivada pela indicação na literatura de que este poderia atuar como aceptor final de elétrons em *B. subtilis* (Nakano & Zuber, 2002). Além disso, o solo, *habitat* natural de *B. subtilis*, contém uma fonte abundante de nitrato.

Na Figura 4.5 e na Tabela A.3, são apresentados os resultados de dois cultivos iguais (I e II), onde a única fonte de nitrogênio foi o sulfato de amônio. O crescimento ocorreu de forma irrestrita até aproximadamente 8 horas, quando a limitação de oxigênio surgiu e o crescimento prosseguiu de forma linear. Uma produção crescente de composto bioativo ocorreu durante esta fase de crescimento limitado, atingindo um valor máximo de atividade, em torno de 21 mm, na fase de declínio, em aproximadamente 79 horas de cultivo. Como esperado, o rendimento em biomassa foi bem menor que o rendimento observado em cultivo aerado. Não foi observada a formação de esporos, nem durante o crescimento nem durante a fase de declínio.



(A)



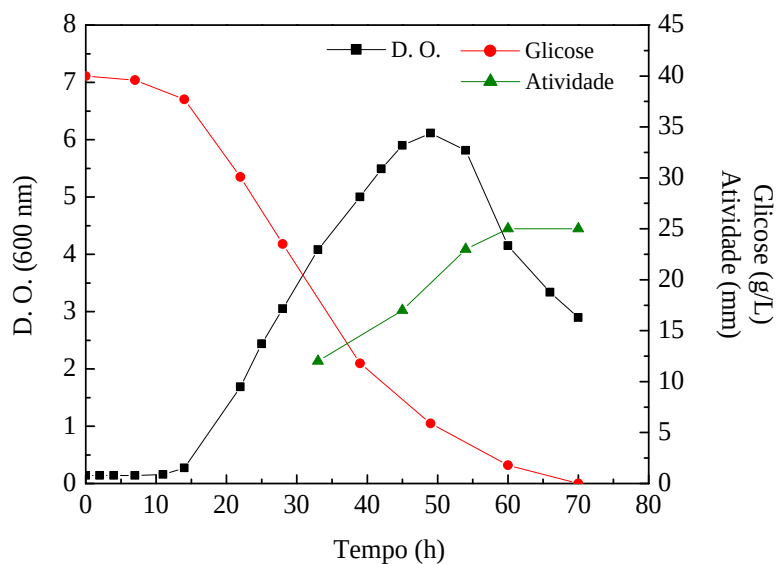
(B)

Figura 4.5. Crescimento, consumo de substratos e atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14, em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas sulfato de amônio como fonte de nitrogênio: (A) cultivo I e (B) cultivo II

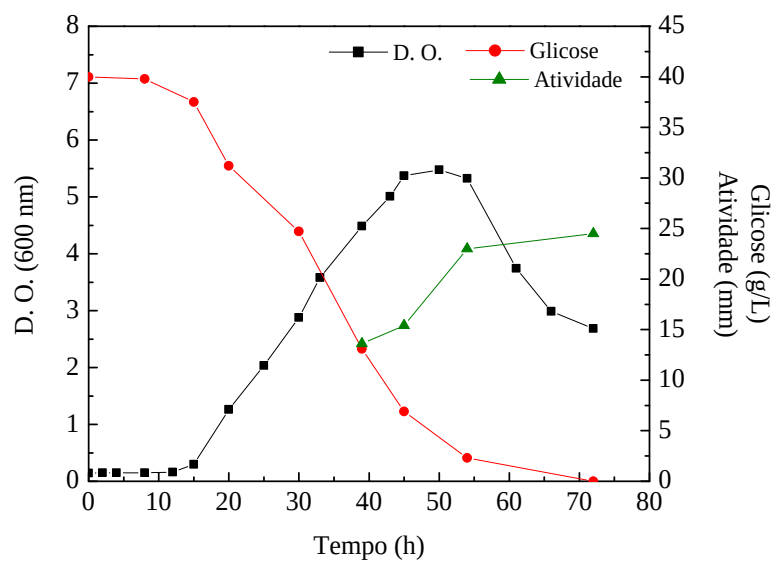
O crescimento e a formação de produto foram também investigados utilizando-se nitrato como única fonte de nitrogênio, em dois cultivos iguais (Figura 4.6 e Tabela A.4). Depois de uma longa fase de latência, um crescimento linear foi também observado, como havia sido observado na presença de amônio como única fonte de nitrogênio. O rendimento em biomassa foi, no entanto, maior neste caso. A ocorrência de uma fase de latência longa pode ser atribuída ao fato de amônio ter sido utilizado no cultivo dos inóculos. Como com amônio, a produção de composto bioativo foi também observada durante o crescimento restrito com nitrato, mas a atividade máxima atingida foi maior, em torno de 25 mm, em aproximadamente 60 horas de cultivo. A formação de esporos não foi observada em nenhuma das etapas do cultivo.

Na Figura 4.7 e Tabela A.5 estão apresentados os resultados obtidos quando amônio e nitrato foram utilizados juntos como fontes de nitrogênio em cultivo descontínuo com restrição de oxigênio. Diferentemente dos casos anteriores, o crescimento não ocorreu de forma linear, sendo bem mais rápido do que os crescimentos observados com as fontes de nitrogênio isoladas. A produção máxima de atividade atingida, em torno de 25 mm, foi semelhante à produção obtida com nitrato, no entanto, o tempo foi bem menor.

B. subtilis foi visto por muito tempo como um microrganismo estritamente aeróbio, mas, recentemente, foi reportado que este também cresce em anaerobiose, tanto pela utilização de nitrato como receptor final de elétrons como por fermentação, na ausência de receptores de elétrons (Nakano & Hulett, 1997; Zuber & Nakano, 1998). O crescimento rápido, observado na presença de amônio e nitrato, pode ser um indicativo de que nitrato atuou como receptor de elétrons.

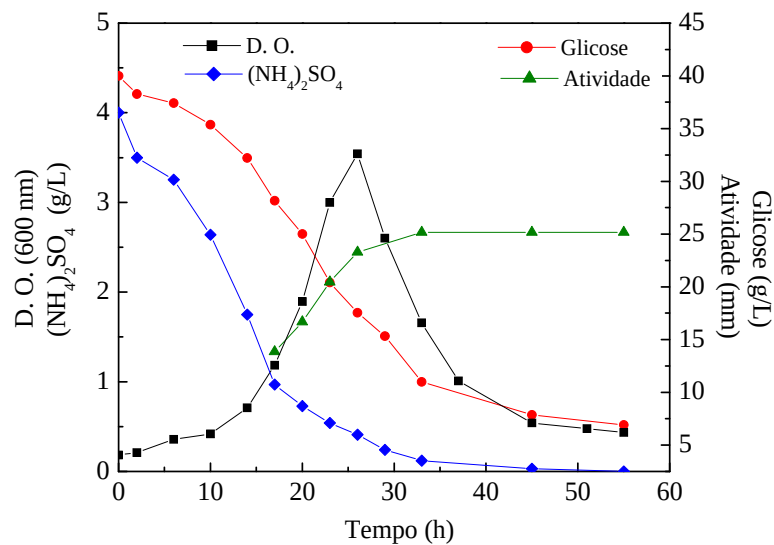


(A)

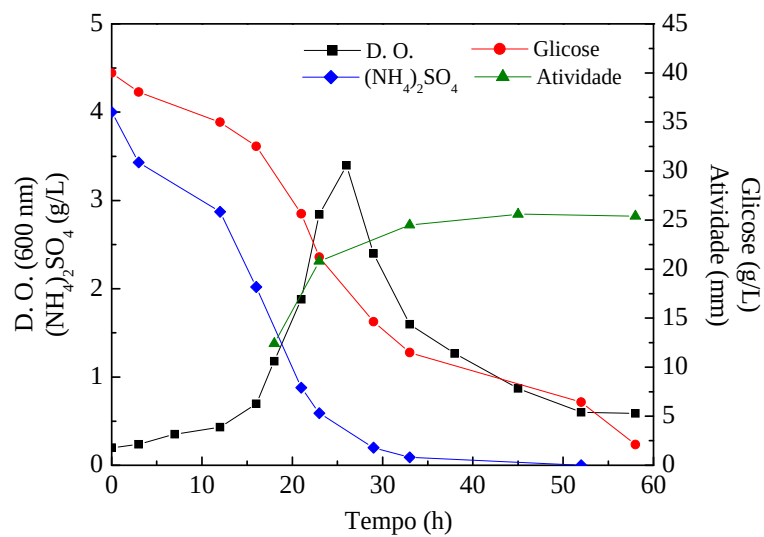


(B)

Figura 4.6. Crescimento, consumo de glicose e atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas nitrato de sódio como fonte de nitrogênio: (A) cultivo I e (B) cultivo II



(A)



(B)

Figura 4.7. Crescimento, consumo de substratos e produção de composto bioativo de *B. subtilis* R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio: (A) cultivo I e (B) cultivo II

Foi realizada análise da formação de esporos em todos os cultivos, porém em todos o resultado foi zero. O processo de esporulação, além de ser desencadeado por condições ambientais desfavoráveis para o crescimento vegetativo, como carência nutricional ou alta densidade celular, tem um outro fator importante que é a atividade do ciclo de Krebs. Em condições anaeróbicas, as três primeiras enzimas do ciclo, que são responsáveis pela síntese de glutamato, não são expressas. A diminuição de glutamato aumenta a concentração de citrato, que atua como quelante de cátions divalentes, como Mn^{2+} e Fe^{2+} . Os cátions Mn^{2+} e Fe^{2+} são importantes neste caso, pois funcionam como ativadores de Spo0A, que é a proteína chave da esporulação (Sonenshein, 2002). Embora a esporulação não tenha sido quantificada com muito tempo após o esgotamento da glicose, segundo Nakano et al. (1998), em condições de aeração restrita, *B. subtilis* não esporula, mesmo após a exaustão de glicose.

4.2.2.1 Composto bioativo produzido por *Bacillus subtilis* R14

A análise do composto produzido por *B. subtilis* R14 foi realizada utilizando-se líquido contendo atividade, obtido de cultivos como descritos nos itens 3.3. e 3.3.2. A tensão superficial do meio líquido foi medida, antes e após extração em fase sólida utilizando-se cartucho C-18. Cromatografia em camada fina foi realizada com o líquido antes da extração em fase sólida e com o eluído do cartucho C-18. Testes de atividade foram também realizados com as mesmas amostras.

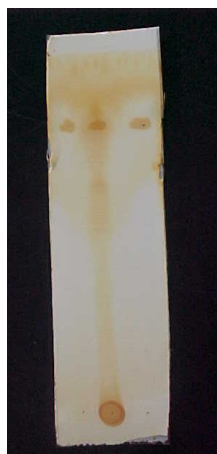
Os resultados de medidas de tensão superficial são apresentados na Tabela 4.2. Após a passagem no cartucho C-18, a tensão superficial do líquido aumentou, indicando a extração de composto com atividade surfactante.

Tabela 4.2. Tensão superficial do meio líquido, contendo composto bioativo de *B. subtilis* R14, antes e após extração em cartucho C-18

Líquido	Tensão Superficial (mN/m)
Antes de passar no cartucho	40,2
Após passar no cartucho	51,3

A cromatografia em camada delgada foi realizada conforme descrito no item 3.3.2. Foram aplicadas três amostras: (A) surfactina comercial (SIGMA); (B) meio líquido contendo composto bioativo, antes de aplicar no cartucho; (C) composto bioativo eluído do cartucho. O fator de retenção (R_f), obtido tanto para a surfactina comercial (SIGMA) como para as amostras analisadas, foi igual a 0,87 (Figura 4.8).

Com as mesmas amostras, foram realizados testes de atividade contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Os resultados mostraram que a surfactina sozinha não apresenta atividade. No entanto, o teste com o meio líquido apresentou um halo de inibição de 14 mm e com a amostra eluída de cartucho C-18 um halo de 23 mm (Figura 4.9). Estes resultados indicam que o composto formado é semelhante, mas não a surfactina, ou uma mistura de mais de um lipopeptídeo, onde surfactina pode estar presente.



A B C

Figura 4.8. Cromatografia em camada delgada: (A) surfactina comercial (SIGMA); (B) líquido contendo composto produzido por *Bacillus subtilis* R14; (C) composto bioativo eluído de cartucho C-18

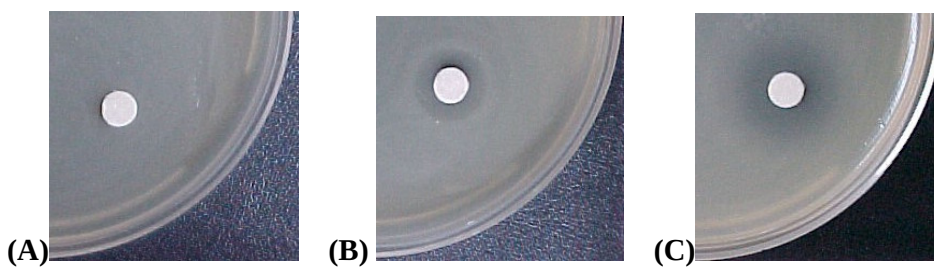


Figura 4.9. Atividade contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* de: (A) surfactina SIGMA; (B) meio líquido contendo composto bioativo de *Bacillus subtilis* R14; (C) composto bioativo eluído de cartucho C-18

Devido à sua propriedade surfactante, a surfactina possui atividade citolítica sobre membranas, além de aumentar a hidrofobicidade da membrana de *Bacillus*, facilitando sua adesividade sobre superfícies sólidas (Vater, 1986; Ahimou *et al.*, 2000). Isoladamente, em geral, a surfactina não apresenta atividade antimicrobiana, mas a ação conjunta com outros lipopeptídeos que apresentam atividade, como, por exemplo, a inturina A, potencializa esta atividade. A atividade citolítica sobre membranas celulares permite o ataque de outros lipopeptídeos (Ohno *et al.*, 1995).

4.2.3 FISILOGIA DE *BACILLUS SUBTILIS* R14 EM ANAEROBIOSE

Para se verificar a capacidade de *B. subtilis* R14 crescer em anaerobiose, foram realizados cultivos em tubos de ensaio, em jarra de anaerobiose, modificando-se a composição dos meios da mesma forma que foi feita em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas sulfato de amônio, apenas nitrato de sódio, e sulfato de amônio com nitrato de sódio.

Apesar de haver estudos que relatem o crescimento de linhagem de *B. subtilis* em anaerobiose (Nakano & Zuber, 2002), não observado crescimento algum para a linhagem de *B. subtilis* R14 com os meios de cultura utilizados. Após 73 horas de cultivo, não ocorreu crescimento do microrganismo em nenhum dos meios, embora nos experimentos controle, em aerobiose, tenha ocorrido crescimento celular, como apresentado na Figura 4.10.

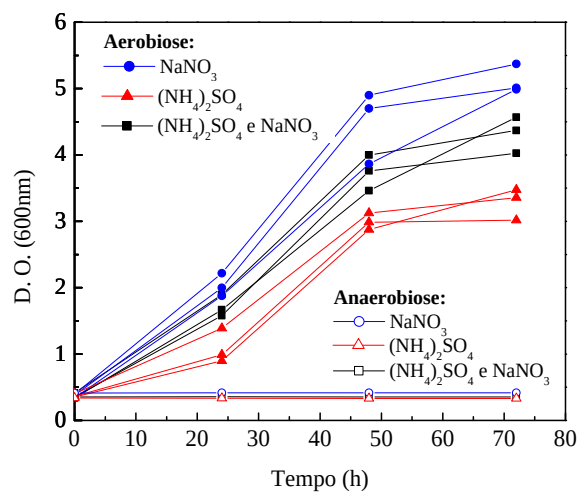


Figura 4.10. Crescimento de *B. subtilis* R14 em tubos de ensaio, em anaerobiose e aerobiose

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- *Bacillus subtilis* R14 apresentou atividade *in vitro* contra oito bactérias fitopatógenas de interesse para a agricultura: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão, *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha em coroa em diversas hospedeiras, *Erwinia amylovora*, agente causal da queima da macieira e da pereira, *Pectobacterium carotovorum*, agente causal da podridão mole em diversas hospedeiras, *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana da batata e do tomate, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira. A linhagem apresenta, portanto, potencial para ser utilizada como agente biocontrolador de amplo espectro de ação contra bactérias fitopatogênicas.
- Em meio mínimo de crescimento, contendo glicose e sulfato de amônio, sob condições nutricionais irrestritas, *B. subtilis* R14 cresce duas vezes mais rápido a 37°C do que a 30°C. As velocidades específicas máximas de crescimento a 37°C e a 30°C são, respectivamente, 0,81 h⁻¹ e 0,39 h⁻¹. Esporulação eficiente pode também ser obtida neste meio. As fontes de carbono e nitrogênio, de fácil assimilação, permitem inicialmente uma rápida velocidade de crescimento e alto rendimento em biomassa. Após uma fase de transição curta, em face à exaustão de glicose, o microrganismo esporula. Como o crescimento, a esporulação é mais eficiente a 37°C.

- Sob restrição de oxigênio, mas em presença de nutrientes essenciais, *B. subtilis* R14 adota a opção de produzir compostos bioativos, o que provavelmente lhe confere vantagem competitiva na natureza. A produção de compostos bioativos ocorre em meios mínimos contendo glicose como fonte de carbono e, como fontes de nitrogênio, sulfato de amônio, nitrato de sódio ou ambos. A atividade é, provavelmente, devida à produção de mais de um lipopeptídeo.
- Em anaerobiose, *B. subtilis* R14 não cresce nem através de fermentação nem por respiração anaeróbica.
- Como sugestão, são necessários estudos para a separação de esporos e caracterização das substâncias produzidas durante o crescimento desses *Bacillus*, para uma possível utilização comercial como um agente de biocontrole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-EL-DAHAB, M.K.; EL-GOORANI, M.A. Antagonistic effect of a *Bacillus subtilis* strain upon *Erwinia amylovora*. **Phytopathological Notes**, v. 54, p. 1285-1286, 1964.

AHIMOU, F., JACQUES, P., DELEU, M. Surfactin and iturin effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 27, p. 749-754, 2000.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied Environmentally Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996.

ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHERFF, S. J. and COELHO, R. S. B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In- **Advances in Biological Control of Plant Diseases**, Eds. T. Wenhua *et al.* Beijing, p. 347-353, 1996.

ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHERFF, S. J. and COELHO, R. S. B. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phyloplane in the field. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects*, Japan: OECD, p. 345-348, 1997.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for biological control of plant diseases. In: RECHCIGL, N. A., RECHCIGL, J. E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis Publishers, p. 95-109, 1997.

BAKER, C. J.; STAVELY, J. R. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 9, p. 770-772, 1985.

BLECKE, H.; HOMUTH, G.; LUDWIG H.; MADER, U.; HECKER, M.; STULKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. **Metabolic Engineering**. USA, v. 2, p. 462-468, 2003.

BONATO, M. C., Esporulação de *Bacillus subtilis*. 2000. Disponível em: <<http://www.biologianaweb.com/livro1/c4/subt/html>>. Acesso em: 10 de setembro de 2003.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and imunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CHATTER, K. F.; BIBB, M. J. Regulation of bacterial antibiotic production. In: KLEINKAUF, H.; DOHER, H. **Products of Secondary Metabolism**. Norwich, p. 58-70, 1997.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

DAVIS, D.A.; LINCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**. UK, v. 3, p. 282-289, 1999.

DEUTSCHER, J.; GALINIER, A.; VERSTRAETE, I. M. Carbohydrate uptake and metabolism. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. **Bacillus subtilis and its Close Relatives from Genes to Cells**. USA, p 129-150 , 2002.

ERRINGTON, J., Determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. **TIGS** 12: 31-34, 1996.

KIM, E.-K.; LEE, B.-S. Lipopeptide production from *Bacillus subtilis* sp. GB16 using a new oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, Korea, v.2,p.128-141, 2004.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Science Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 1 e 2, p. 89-96, 1997.

LEIFERT, C.; ARBOUR, A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal Applied Bacteriological**, v. 78, p. 97-108, 1995.

LUNA, C. L.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO MAIOR, A. M. Production of a biocontrol agent for crucifers black not disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p. 133-140, 2002.

LUZ, W. C. Rhizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** , v. 4, p. 1-49, 1996.

MARAHIEL, M. A.; NAKANO, M. M.; ZUBER, P. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. **Molecular Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 631-636, 1993.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Editora Embrapa: Jaguariúna, SP, v. 1. p. 17-30, 1998.

MENEZES, E. P .S.; L.; MARIANO, R. L. R.; GOUVEIA, E. R. Produção de substância ativa contra *Acidovorax avenae subsp. citrulli* agente da mancha aquosa do melão. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 2000, Florianópolis. **Anais Simpósio**. Santa Catarina, 2003. CD-ROM.

MONTEIRO, L. **Produção de Substâncias Bioativas de Bacillus spp. contra Xanthomonas campestris**. Recife, PE, Universidade Federal de Pernambuco, 2002, 63p. (Dissertação).

MONTEIRO, L.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.17, p. 178-184, 2005

MULIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**. USA, v. 7, p. 362-366, 2004.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P.; SONENSHEIN, A. L. Anaerobic regulation of. *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. **Journal Bacteriological** , p. 3304-3311, 1998.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P. Anaerobiosis. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and its Closets Relatives from Genes to Cells** , p 393-404, 2002.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptides antibiotics, iturin A and surfactant by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 517-519, 1995.

PEREGO, M., A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. **Academy Science**. USA 94: 8612-8617, 1997.

PIGGOT, P.J., Spore development in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion Genetics & Development**. v.6, 531-537, 1996.

PUSEY, P. L. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. **Pesticide Science**, v. 27, p. 133-140, 1989.

SANTOS, E. R. **Controle Biológico da Manha Aquosa do Melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***. Recife, PE, Universidade Federal de Pernambuco, 2004, 74p. (Dissertação)

SHODA, M. Review: Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SMITH, I. Regulatory proteins that control late-growth development. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria**. Washington, American Society for Microbiology, p. 897-916, 1993.

SONENSHEIN, A. L. The Krebs Citric Acid Cycle. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and its Closets Relatives from Genes to Cells**, USA, p. 151-162, 2002

VATER, J. Lipopeptides, an Attractive Class of Microbial Surfactants. **Program Colloid & Polymer Science**, v. 72, p. 12-18, 1986.

ZUBER, P.; NAKANO, M. M.; MARAHIEL, M. A. Peptide antibiotics. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria***. USA, p. 902-904, 1993.

ZUBER, P.; MARAHIEL, M. P. Structure, function and regulation of genes encoding multidomain peptide synthetases. In: STRHOL, William. **Biotechnology of Antibiotics**. New York USA, p. 189, 1997.

APÊNDICE A

Tabelas de Resultados

Tabela A.1. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de *B. subtilis* R14 em condição irrestrita de oxigênio, a 37°C

TEMPO (h)	DENSIDADE ÓTICA	GLICOSE (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	ESPOROS (UFC/mL)
0	0,4301	10,0	2,00	-
2	0,5991	9,70	1,98	-
3	0,9001	-	-	-
4	1,9980	8,57	1,57	-
4,5	2,2050	-	-	-
5	3,7001	-	-	-
5,5	4,5789	5,40	1,04	-
6	7,9322	-	-	-
6,5	11,0045	-	-	-
7	13,1200	2,13	0,43	-
7,5	12,7945	-	-	-
8	12,0999	0,95	-	-
8,5	11,7540	-	-	-
9,5	11,3001	-	-	-
10,5	10,6080	0,49	0,09	-
12,5	10,1374	-	-	2x10 ⁴
14	9,4343	0,10	0,01	3x10 ⁶
16	7,6100	-	-	5x10 ⁷
21	7,0001	0,00	0,0	1x10 ⁸
23	6,9190	-	-	1x10 ⁸
26	6,7489	-	-	-

Tabela A.2. Crescimento, consumo de substratos e esporulação de *B. subtilis* R14 em condição irrestrita de oxigênio, a 30°C

TEMPO (h)	DENSIDADE ÓTICA	GLICOSE (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	ESPOROS (UFC/mL)
0	0,38331	10,0	2,0	-
1,5	0,73008	9,70	1,98	-
5	0,94265	-	-	-
7	1,76445	8,57	1,57	-
8	2,72094	-	-	-
9	3,84368	-	-	-
10	6,04240	5,40	1,04	-
11	8,51600	-	-	-
12	11,79060	-	-	-
13	12,82120	2,13	0,43	-
14,5	11,78660	-	-	-
17,5	9,21410	0,95	-	-
20	9,35000	-	-	1x10 ⁴
22	7,12810	-	-	-
24	1,95632	0,49	0,09	1x10 ⁵
27	1,18800	-	-	-
30	1,18500	0,10	0,01	3x10 ⁵

Tabela A.3. Crescimento, consumo de substratos e atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (cultivos I e II) * Amostras testadas e que não apresentaram atividade

TEMPO (h)	DENSIDADE ÓTICA	GLICOSE (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	ATIVIDADE (mm)
CULTIVO I				
0	0,19917	40,00	8,00	-
3	0,21620	-	-	*
7	0,31332	36,78	7,20	-
9	0,42113	-	-	*
11	0,47748	31,87	5,90	-
15	0,59874	-	-	*
22	0,80537	23,69	4,70	*
24	0,84423	-	-	-
28	0,95381	-	-	11 (±0,8)
33	1,11320	15,84	3,70	-
35	1,15610	-	-	-
39	1,23859	-	-	-
46	1,33430	12,36	2,90	15 (±0,4)
55	1,38940	10,02	2,20	-
59	1,37124	-	-	-
62	1,34745	7,70	1,60	18 (±0,2)
69	1,19874	4,64	1,02	-
72	1,10300	-	-	21 (±0,8)
76	1,06000	2,01	0,91	-
79	1,05278	1,89	0,87	21 (±0,88)
CULTIVO II				
0	0,22026	40,00	8,00	-
4	0,23789	-	-	-
8	0,34014	35,92	6,91	*
10	0,42997	-	-	-
11	0,48753	30,7	5,53	*
14	0,60114	-	-	*
22	0,79978	-	-	-
25	0,85963	19,51	3,92	11,2 (±0,8)
28	0,96741	-	-	-
34	1,12369	13,82	3,12	-
37	1,17003	-	-	13,5 (±0,4)
39	1,23785	-	-	-
45	1,38975	10,36	-	14,0 (±0,1)
54	1,57423	6,00	1,95	-
59	1,44752	-	-	-
61	1,33897	-	-	18,8 (±0,2)
69	1,10025	3,01	0,87	-
70	1,00091	-	-	-
77	0,95473	0,53	0,23	-
78	0,90586	0,00	0,06	20,4 (±0,6)

Tabela A.4. Crescimento, consumo de glicose e atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14 em condição de restrição de oxigênio, utilizando-se apenas nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (cultivos I e II)

* Amostras testadas e que não apresentaram atividade

TEMPO (h)	DENSIDADE ÓTICA	GLICOSE (g/L)	ATIVIDADE (mm)
CULTIVO I			
0	0,13895	40,00	-
2	0,13899	-	-
4	0,13997	-	-
7	0,14012	39,6	*
11	0,15879	-	*
14	0,26875	37,7	-
22	1,68754	30,1	*
25	2,43652	-	-
28	3,04589	23,5	-
33	4,07890	-	12,2 ($\pm 0,2$)
39	4,99850	11,8	-
42	5,48972	-	-
45	5,89923	-	16,6 ($\pm 0,4$)
49	6,11352	5,9	-
54	5,81369	-	23,5 ($\pm 0,2$)
60	4,14672	1,8	25,6 ($\pm 0,4$)
66	3,33470	-	-
70	2,89560	0,0	25,6 ($\pm 0,4$)
CULTIVO II			
0	0,14569	40,00	-
2	0,14677	-	-
4	0,14711	-	-
8	0,14785	39,8	*
12	0,15961	-	-
15	0,29879	37,5	*
20	1,25987	31,2	-
25	2,03674	-	*
30	2,87561	24,7	-
33	3,57894	-	-
39	4,48629	13,1	13,6 ($\pm 0,2$)
43	5,00987	-	-
45	5,36989	6,9	15,4 ($\pm 0,18$)
50	5,47562	-	-
54	5,32456	2,3	23,0 ($\pm 0,22$)
61	3,74230	-	-
66	2,98756	-	-
72	2,68754	0,0	24,5 ($\pm 0,4$)

Tabela A.5. Crescimento, consumo de substratos e atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14 em condições de restrição de oxigênio, utilizando-se nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio (cultivos I e II)

* Amostras testadas e que não apresentaram atividade

TEMPO (h)	DENSIDADE ÓTICA	GLICOSE (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	ATIVIDADE (mm)
CULTIVO I				
0	0,18305	40,00	4,00	-
2	0,21067	38,27	3,50	-
6	0,35620	37,41	3,25	*
10	0,41803	35,37	2,64	*
14	0,70863	32,22	1,75	-
17	1,18573	28,15	0,97	12,2 (±0,2)
20	1,89540	25,00	0,73	15,0 (±0,6)
23	2,99874	20,40	0,54	19,4 (±0,6)
26	3,54340	17,53	0,41	22,0 (±0,4)
29	2,59990	15,34	0,24	-
33	1,65645	10,98	0,12	24,0 (±0,1)
37	1,00960	-	-	-
45	0,54084	7,87	0,03	24,2 (±0,8)
51	0,47896	6,90	-	-
55	0,43259	-	0,00	24,3 (±0,8)
CULTIVO II				
0	0,20036	40,00	4,00	-
3	0,23641	38,06	3,43	-
7	0,35274	-	-	*
12	0,43103	34,98	2,87	*
16	0,69523	32,51	2,02	-
18	1,18002	-	-	12,4 (±0,6)
21	1,87962	25,65	0,88	-
23	2,84002	21,23	0,59	20,8 (±0,2)
26	3,39742	-	-	23,8 (±0,2)
29	2,39866	14,64	0,20	-
33	1,59760	11,5	0,09	24,5 (±0,5)
38	1,26524	-	-	-
45	0,87024	-	0,00	25,6 (±0,4)
52	0,60053	-	-	-
58	0,58703	-	-	25,4 (±0,5)

APÊNDICE B

**Artigo enviado para apresentação no
XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**

Sporulation and Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* R14

André Lacerda Ulysses de Carvalho¹, Rosa de Lima Ramos Mariano²

Ester Ribeiro Gouveia¹, and Ana Maria Souto-Maior¹

¹Departamento de Antibióticos, UFPE, Cidade Universitária, 50.670-901, Recife-PE

²Departamento de Agronomia/Fitossanidade, UFRPE, Dois Irmãos 52.071-900, Recife-PE

ABSTRACT

Several strains of Bacillus subtilis produce lipopeptides, which are amphiphilic compounds with surfactant and antimicrobial activities. Production of lipopeptide, sporulation and competence in B. subtilis are interconnected through a complex array of controlling elements. In this work, to identify stimuli that favor the synthesis of lipopeptides and sporulation, the physiology of B. subtilis R14 was investigated in synthetic medium, containing glucose and NH₄SO₄/NaNO₃ as carbon and nitrogen sources, under unrestricted and restricted oxygen availability. Growth, production of bioactive compounds and sporulation were followed during cultivations in a 4-liter working-volume batch bioreactor, at temperature and pH regulated at 37°C and 7, respectively. In excess-oxygen culture, B. subtilis R14 did not produce bioactive compounds in detectable amounts in any growth phase and sporulated after glucose depletion, reaching 10⁸ CFU/mL. In oxygen-limited culture, sporulation did not occur, but increasing concentration of bioactive compounds was observed during the restricted growth. No growth was observed under anaerobiosis.

INTRODUCTION

The genus *Bacillus* is one of the most utilized in the biocontrol of phytopathogens. This genus comprehends a heterogeneous group of Gram-positive, aerobic or facultative anaerobic, endospore-forming bacteria. The endospores are thermotolerant structures, resistant to dryness, to ultraviolet radiation and to organic solvents. These properties, associated to the ability of producing peptide antibiotics, contribute to the utilization of this genus on the biocontrol of several root and foliar diseases (Backman *et al.*, 1997; Kloepper, 1997; Melo, 1998). Bacilli are involved in the control of plant diseases through a variety of mechanisms of action, such as competition, systemic resistance induction and antibiotic production. The mechanism of antibiosis has been shown to be one of the most important (Tomashow & Weller, 1996). Among several peptide antibiotics, they produce lipopeptides, which are amphiphilic compounds with surfactant activity.

Peptide antibiotics are composed of aminoacids, but they often show little similarity to gene-encoded polypeptides in terms of structure and mechanism of their biosynthesis (Zuber *et al.*, 1993; Zuber and Marahiel, 1997). Several strains of *B. subtilis* produce cyclic lipopeptides, among them surfactin, which is the most powerful biosurfactant known. Transcription of the *urfA* operon is the major point of regulation of surfactin production, and it

has turned out to involve a complex array of controlling elements including autoregulation, phosphorylation cascades, extracellular signaling, and interplay with the regulation of different developmental pathways (Chater and Bibb, 1997).

B. subtilis R14 is an epiphytic isolate obtained from the surface of kale leaves. The antagonism of this isolate was investigated against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of the black rot of crucifers, and *Acidovorax avenae* var. *citrulli*, causal agent of the blotch of melon. In greenhouse experiments, the isolate completely controlled the black rot of cabbage when tested against three strains of *X. campestris* pv. *campestris* in all application periods tested (Assis *et al.*, 1996). When submitted to field tests, this same isolate had its efficiency corroborated, reducing 73% of the disease (Assis *et al.*, 1997). The control of the bacterial fruit blotch caused by *A. avenae* subsp. *citrulli* was investigated *in vivo* by treating infected yellow melon seeds with broths of *B. subtilis* R14 cultivation (Santos, 2004). Treatments, with and without cells, showed no significant difference, indicating that the inhibition of *A. avenae* subsp. *citrulli* growth occurred due to the presence of bioactive compounds produced during cultivation. The mechanism of antibiosis was confirmed *in vitro* against nine strains of *X. campestris* pv. *campestris*, and the compounds produced were characterized as lipopeptides (Monteiro, 2002; Monteiro *et al.*, 2005).

Production of secondary metabolites is normally associated with the bacterium's response to a growth-limiting environment. Faced with the depletion of essential nutrients, *B. subtilis* can adopt several responses, including motility, secretion of extracellular enzymes, competence for genetic transformation, antibiotic production, and finally sporulation. Depending on the environmental signal, one or more of these alternative processes can be stimulated or inhibited (Smith, 1993). In this work, the physiology of *B. subtilis* R14 was investigated in excess-oxygen and oxygen-limited batch cultures to identify stimuli for bioactive compound synthesis and sporulation.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and Culture Media

Microorganism. *B. subtilis* R14, isolated from the surface of kale leaves, was used in this work. The microorganism belongs to the Culture Collection of the Laboratory of Phytobacteriology of the Federal Rural University of Pernambuco. The isolate was preserved on nutrient agar slopes at 5° C and subcultured every three months.

Excess-oxygen. For excess-oxygen cultivation, the medium consisted of (per liter of distilled water): glucose, 10; (NH₄)₂SO₄, 2; K₂HPO₄, 13.6; MgSO₄·7H₂O, 0.2; trace elements solution, 10 mL. The trace elements solution consisted of (per liter of distilled water): CaCl₂, 0.42 g; FeSO₄·7H₂O, 2.29 g; MnCl₂·4H₂O, 0.10 g; ZnCl₂, 0.17 g; CuCl₂, 0.03; CoCl₂·6H₂O, 0.06; and Na₂MoO₄·2H₂O, 0.06; pH 7.

Oxygen-limitation. For oxygen-limited culture, the concentrations of glucose and ammonium sulphate were increased to (per liter of distilled water): glucose, 40 g; (NH₄)₂SO₄, 8 g. Growth was also investigated on medium containing a mixture of ammonium and nitrate: NaNO₃, 4 g, and (NH₄)₂SO₄, 4 g; and on medium containing nitrate as the sole nitrogen source: NaNO₃, 8 g. These media were also used to investigate growth under anaerobic condition.

Cultivation Conditions

Preculture. Inocula were grown in Fernbach flasks on glucose/(NH₄)₂SO₄ medium in a rotatory shaker (model C25KC, New Brunswick Scientific), at 37° C and 250 rpm, and 5% v/v was used to inoculate the bioreactor.

Bioreactor. The cultivations were performed in an instrumented 4-liter working-volume batch reactor (BiofloIII, New Brunswick Scientific). For excess-oxygen culture, the aeration and agitation rates were kept at 1 vvm and 700 rpm, respectively. Cultivations were carried out at 30° C and 37° C. For oxygen-limited culture, no forced aeration was used and the agitation was reduced to 300 rpm. For anaerobic condition, the cultivations were not carried out in the bioreactor, but in test tubes, which were incubated in Gaspak jar.

Analytical Methods

Biomass. Biomass concentration was determined spectrophotometrically at 600 nm (Hewlett Packard 8453).

Substrates. Glucose and (NH₄)₂SO₄ concentrations were assayed utilizing GOLD ANALISA enzymatic kits (glucose-PP and urea UV-PP, respectively).

Bioactive compounds. Antimicrobial activity was determined using agar diffusion method and *Agrobacterium tumefaciens* as the microorganism-test. Activity was expressed as diameter of inhibition halo (mm).

RESULTS AND DISCUSSION

Excess-Oxygen Cultures

Figure 1 and Figure 2 present the results obtained during cultivation of *B. subtilis* R14 under unrestricted oxygen availability at 30°C and 37°C, respectively. Growth rate during the exponential phase at 30°C was half than at 37°C (Figure 3), and the maximum biomass concentration reached was the same. The calculated maximum specific growth rates were 0.39 h⁻¹ and 0.81 h⁻¹, respectively. In the post-exponential growth phase, production of bioactive compounds was not detected in neither cases. Sporulation occurred in both cases in response to exhaustion of glucose. As with growth, sporulation rate was higher at 37°C, where a final concentration of 10⁸ CFU/mL was attained.

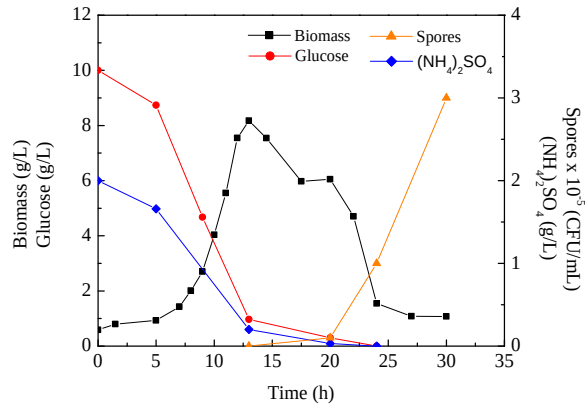


Figure 1. Time course of cell growth, substrate consumption, and sporulation, during aerated cultivation of *Bacillus subtilis* R14 at 30° C

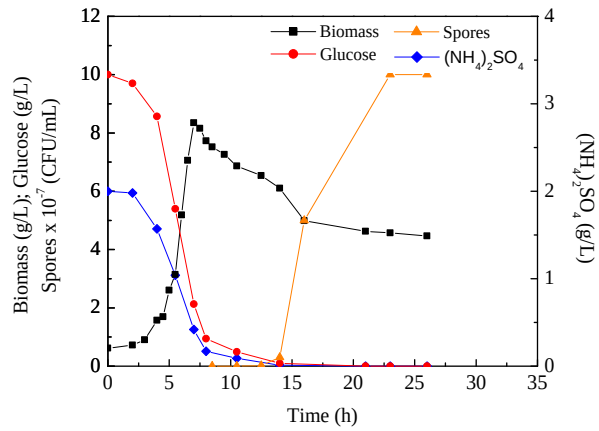


Figure 2. Time course of cell growth, substrate consumption, and sporulation, during aerated cultivation of *Bacillus subtilis* R14 at 37° C

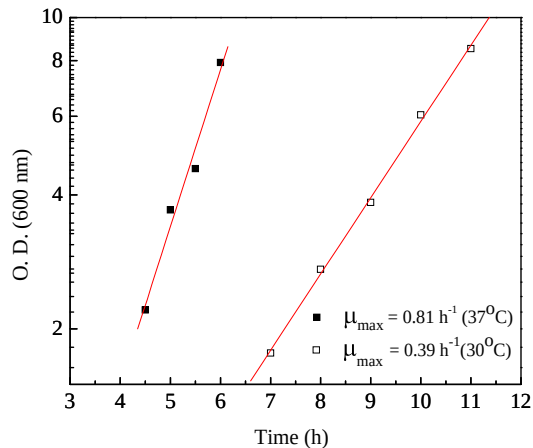


Figure 3. Time course of cell growth during the exponential growth phase of cultivations of *Bacillus subtilis* R14 at 30° C and 37° C

Oxygen-Limited Cultures

Figure 3 presents the results obtained during oxygen-limited culture. Growth proceeded unrestricted until around 8 hours, when oxygen limitation took place. Growth followed with a linear pattern and increasing bioactive compound concentrations were detected during this phase. Biomass reached a much lower maximum concentration than in unrestricted growth, even though the medium composition had four times more glucose and concentrations.

B. subtilis was viewed as an strict aerobe, but recently it has been reported that it also grows anaerobically either by utilizing nitrate or nitrite as an eletron acceptor or by fermentation in the absence of eletron acceptors (Nakano and Hulett, 1997; Nakano and Zuber, 1998). Figure 5 shows the effect on the growth of *B. subtilis* 14 of adding half the nitrogen content of the medium as sodium nitrate. Growth rate and yield on substrate were enhanced, and a exponential pattern was observed instead of a linear pattern, what may indicate that nitrate was used as a final eletron acceptor. The same final concentration of bioactive product was reached, but the productivity was increased.

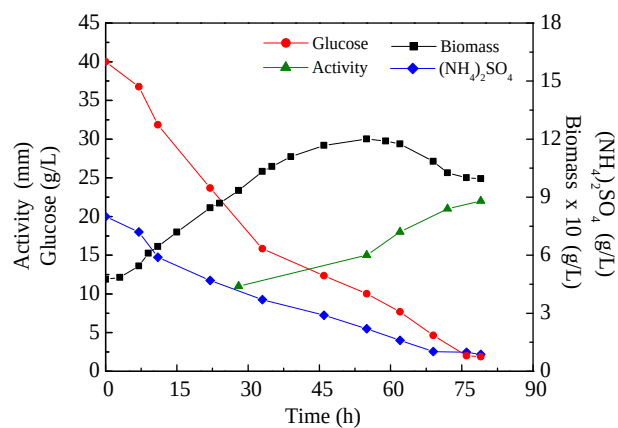


Figure 4. Time course of cell growth, substrate consumption, and bioactive compound production, during oxygen-restricted cultivation of *Bacillus subtilis* R14, at 37° C, with ammonium sulphate as sole nitrogen source

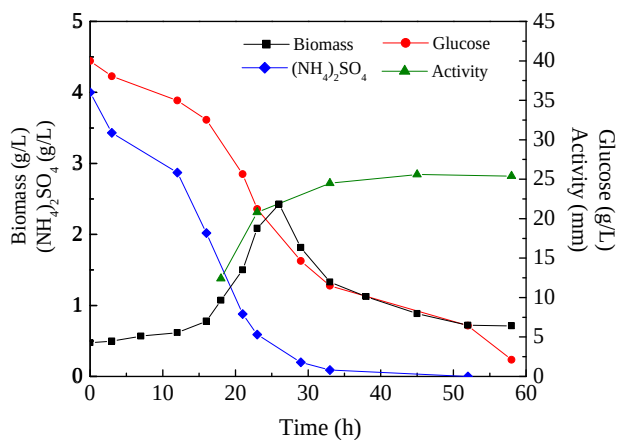


Figure 5. Time course of cell growth, substrate consumption, and bioactive compound production, during oxygen-restricted cultivation of *Bacillus subtilis* R14 at 37° C, with ammonium sulphate and sodium nitrate as nitrogen sources.

Growth and product formation was also investigated using nitrate as the sole nitrogen source (Figure 6). A linear growth pattern was observed as when ammonium sulphate was present the sole nitrogen source (Figure 4). The lag phase observed in this case can be attributed to the fact that the bioreactor inoculum was grown on ammonium sulphate.

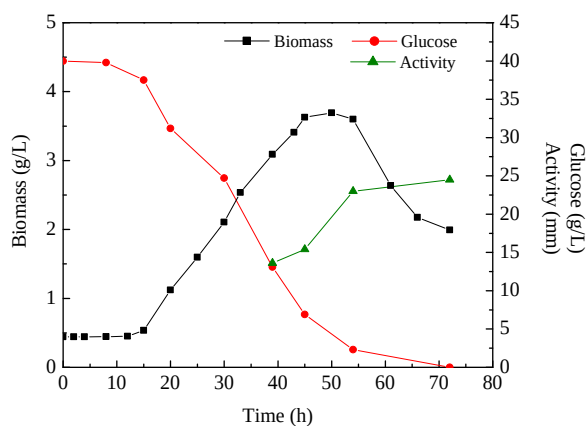


Figure 6. Time course of cell growth, substrate consumption, and bioactive compound production, during oxygen-restricted cultivation of *Bacillus subtilis* R14 at 37° C, with sodium nitrate as the sole nitrogen source

Anaerobic Cultures

To investigate growth of *B. subtilis* R14 under anaerobic condition, cultures were carried out in anaerobic Gaspak jar, with the same media used for oxygen-limited cultures. However, neither fermentation nor nitrate respiration could be observed. After 72 hours of inoculation, no growth was observed in any case studied.

CONCLUSION

Efficient sporulation of *B. subtilis* R14 can be achieved on glucose/ammonium synthetic medium in excess-oxygen culture. The readily metabolizable carbon and nitrogen sources allow initially fast growth rate and high biomass yield. After a short transition phase, faced with the complete depletion of glucose, the microorganism is committed to sporulation as a mean of survival. Under oxygen-limitation, but in the presence of essential nutrients, *B. subtilis* R14 adopts the option of producing bioactive compounds, which probably confer competitive advantage to the organism in nature. Under anaerobic condition, the organism do not grow neither through fermentation nor anaerobic respiration.

REFERENCES

- Assis, S. M. P.; Mariano, R. L. R.; Michereff, S. J. and Coelho, R. S. B. (1996), Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In- *Advances in Biological Control of Plant Diseases*, Eds. T. Wenhua et al. Beijing, p. 347-353.
- Assis, S. M. P.; Mariano, R. L. R., Michereff, S. J. and Coelho, R. S. B. (1997), Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phyloplane in the field. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Present Status and Future Prospects*. Japan: OECD, p. 345-348.

Backman, P. A.; Wilson, M. and Murphy, J. F. (1997), Bacteria for biological control of plant diseases. In: N. A. Rechcigl & J. E. Rechcigl (Eds.) *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*, p. 95-109.

Chater, K. F. and Bibb, M. J. (1997), Regulation of bacterial antibiotic production. In: H.-J. Rehm and G. Reed (Eds.) *Biotechnology: Products of Secondary Metabolism*. Weinheim, VCH, p.57-105.

Kloepper, J. W. (1997), Current status and future trends in biocontrol research and development in the U. S.. *Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture*, Japan, p. 49-52.

Melo, I. S. (1998), Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (Eds.) *Controle Biológico*. Embrapa: Jaguariúna, v. 1, p. 17-30.

Monteiro, L. (2002), Produção de Substâncias Bioativas de *Bacillus spp.* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. MSc. Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Monteiro, L.; Mariano, R. L. R. and Souto-Maior (2005), Antagonism of *Bacillus spp.* against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

Nakano, M. M., and Hulett, F. M. (1997), Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbial Letters*, 157, p. 1-7.

Nakano, M. M., and Zuber, P. (1998), Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52, p. 165-190.

Santos, E. R. (2004), Controle biológico da mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. MSc. Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Smith, I. (1993), Regulatory proteins that control late-growth development. In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick (Eds.) *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*. Washington, American Society for Microbiology, p. 897-916.

Thomashow, L. S. & Weller, D. M. (1996), Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: G. Stacey & N.T. Keen (Eds.) *Plant-Microbe Interactions*. New York, Chapman & Hall, v. 1, p. 187-235.

Zuber, P.; Nakano, M. M. & Marahiel, M. A. (1993), Peptide antibiotics. In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick (Eds.) *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*. Washington, American Society for Microbiology, p. 897-916.

Zuber, P. and Marahiel, M. A. (1997), Structure, function, and regulation of genes encoding multidomain peptide synthetases. In: W. R. Strohl (Ed.) *Biotechnology of Antibiotics*, 2nd Edition. New York, Marcel Dekker, p. 187-216.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.