

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

**FISIOLOGIA DE *Bacillus subtilis* R14: CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
LIPOPEPTÍDEOS EM CULTIVOS DESCONTÍNUOS**

Fábio Henrique Portella Corrêa de Oliveira

Recife – 2006

Fábio Henrique Portella Corrêa de Oliveira

**FISIOLOGIA DE *Bacillus subtilis* R14: CRESCIMENTO E
PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS EM CULTIVOS
DESCONTÍNUOS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Souto Maior

Recife – 2006

Oliveira, Fábio Henrique Portella Corrêa de.
Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14 : crescimento e
produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos
/ Fábio Henrique Portella Corrêa de Oliveira. – Recife
: O Autor, 2006.
68 folhas. : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Antibióticos – Biotecnologia de produtos
bioativos. 2. Compostos bioativos – Produção de
lipopeptídeos – Influência da aeração, da temperatura
e caracterização química – Metodologia da TLC (Thin
Layer Chromatography). 3. Crescimento microbiano –
Produção de esporos – Aeração e temperatura –
Anaerobiose. I. Título.

579.222
579.362

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

UFPE
BC2006-103

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE Mestrado apresentada por *FÁBIO HENRIQUE PORTELLA CORRÊA DE OLIVEIRA* 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 23 DE FEVEREIRO DE 2006 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dr. IRAPUAN OLIVEIRA PINHEIRO
Departamento de Ciências Fisiológicas - UPE



Dra. MÁRCIA MARIA CAMARGO DE MORAIS
Departamento de Patologia - UPE

A toda minha família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e força de vontade de batalhar pelos meus ideais.

A minha família, em especial, minha mãe e minha avó pelas palavras animadoras, pela força dada e pela mão amiga nas horas em que a emoção se sobrepunha à razão e a auto-estima e o equilíbrio emocional ameaçavam decair.

À prof^a Ana Maria Souto Maior, pela dedicação na orientação no decorrer deste trabalho bem como pelos ensinamentos e discussões científicas valiosas para o crescimento pessoal e profissional.

A todos os professores que compõem o Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, em especial a Eulália Azevedo Ximenes, Glícia Maria Torres Calazans, Janete Magali, Márcia Nascimento, Ester Ribeiro Gouveia, Kêsia Xisto pelas prestimosas ajudas nos campos da microbiologia e da química, bem como nas palavras de incentivo quando as forças para continuar em frente pareciam esgotar-se.

A todos os professores dos Departamentos de Farmácia e Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio no empréstimo de materiais, bem como nas explicações valiosas para solução de problemas que surgiam no decorrer no trabalho.

À prof^a Rosa de Lima Ramos Mariano, da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela doação dos microrganismos utilizados no trabalho.

Ao prof. Irapuan Oliveira Pinheiro, da Universidade de Pernambuco pela ajuda na condução das atividades e manipulação de equipamentos necessários para o bom andamento dos trabalhos.

A todos os amigos do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, em especial, Ana Paula Valentim, Cleiton Bispo, Cynthia Gisele, Edineide Farias, Fernanda Borba, Fernanda Vaz, Samantha Pinheiro, Rosa, Vânia agradeço a força, as conversas animadoras, os bons momentos, a mão amiga nas horas difíceis e a amizade construída no período de convivência.

Aos amigos Paulo André Fernandes e Isabel Renata meu muito obrigado, pela força e ajuda na execução das atividades necessárias para o andamento do trabalho, bem como as companhias nos finais de semana em prol da “PRODUÇÃO!”.

A Karlla Rebeka da Silva Santos, Maria de Lourdes Gomes da Silva e Fátima Gomes pelas palavras animadoras, pela força dada e pela mão amiga nas horas em que a auto-estima e o equilíbrio emocional ameaçavam decair.

Aos componentes e ex-componentes do Laboratório de Processos Fermentativos: Manuella Cristina, Claudemir Santos da Costa e André Carvalho pela ajuda na adaptação inicial às atividades do laboratório bem como na amizade construída no período de convivência.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco: Fátima Regina, Orlando, Sr. Zeca, Luiz Carlos e Suely pelas ajudas concedidas.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste trabalho.

À Coordenadoria de Apoio ao Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Lipopeptídeos Produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	3
2.1.1 Surfactinas e Iturinas	3
2.2 Controle Biológico por <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.2.1 Atividade Antimicrobiana	8
2.2.2 Atividade Surfactante	10
2.2.3 Formação de Biofilmes	11
2.3 Metabolismo e Fisiologia de <i>Bacillus subtilis</i>	12
2.3.1 Vias Centrais de Catabolismo	12
2.3.2 Metabolismo Anaeróbico	14
2.3.3 Metabolismo Secundário: síntese de lipopeptídeos e regulação gênica	16
2.3.4 Esporulação: mecanismo e regulação gênica	21
2.3.5 Comparação Entre a Regulação da Síntese de Lipopeptídeos e da Esporulação	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Microrganismos	28

3.2 Meios de Cultura	28
3.2.1 Meios de Conservação	28
3.2.2 Meios de Reativação	29
3.2.3 Meio para Produção de Lipopeptídeos	29
3.2.4 Meios para Avaliar o Crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> R14 em Anaerobiose	30
3.3 Procedimento Experimental	32
3.3.1 Crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> R14 em Anaerobiose	32
3.3.2 Crescimento e Produção de Lipopeptídeos por <i>Bacillus subtilis</i> R14	32
3.4 Métodos Analíticos	33
3.4.1 Concentração de Biomassa	33
3.4.2 Atividade Antimicrobiana	34
3.4.3 Atividade Emulsificante (E ₂₄)	35
3.4.4 Concentração de Glucose	35
3.4.5 Concentração de Nitrito	35
3.4.6 Concentração de Esporos Viáveis	36
3.5 Caracterização Parcial de Compostos Bioativos	36
3.5.1 Separação e Extração	36
3.5.2 Cromatografia em Camada Delgada	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Crescimento de <i>B. subtilis</i> R14 em Anaerobiose	38
4.2 Crescimento sob Diferentes Condições de Temperatura e Aeração	41

4.2.1 Temperatura.....	41
4.2.2 Aeração	41
4.2.3 Consumo de Substratos	42
4.2.4 Comportamento do pH	42
4.3 Produção de Compostos Bioativos sob Diferentes Condições de Temperatura e Aeração	45
4.3.1 Produção <i>versus</i> Crescimento Microbiano	45
4.3.2 Temperatura	48
4.3.3 Aeração	48
4.4 Produção de Compostos Surfactantes sob Diferentes Condições de Temperatura e Aeração.....	49
4.4.1 Temperatura	50
4.4.2 Aeração	50
4.5 Produção de Esporos sob Diferentes Condições de Aeração e Temperatura	50
4.6 Extração e Caracterização Parcial de Compostos Bioativos Produzidos por <i>B. subtilis</i> R14	52
5. CONCLUSÕES	56
6. PERSPECTIVAS	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Lipopeptídeos produzidos por <i>B. subtilis</i>	4
Figura 2.2 – Vias centrais do metabolismo do carbono em <i>B. subtilis</i>	13
Figura 2.3 – Produtos resultantes do processo fermentativo em <i>B. subtilis</i>	15
Figura 2.4 – Síntese de peptídeos por via ribossomal	17
Figura 2.5 – Mecanismo multienzimático de produção de lipopeptídeos	18
Figura 2.6 – Síntese de surfactina	20
Figura 2.7 – Mecanismo de formação de esporos em <i>B. subtilis</i>	23
Figura 2.8 – Regulação da esporulação de <i>B. subtilis</i>	25
Figura 2.9 – Mecanismo integrado entre a síntese de surfactina e competência microbiana em <i>B. subtilis</i>	26
Figura 2.10 - Cascata de transdução de sinais que desencadeia a ativação de genes relacionados com a esporulação de <i>B. subtilis</i>	27
Figura 3.1 - Curva de calibração plotada entre os valores de biomassa e de absorbância em cultivos de <i>B. subtilis</i> R14 em meio quimicamente definido	34
Figura 4.1 - Variação da concentração da biomassa de <i>B. subtilis</i> R14 em diferentes meios de cultivo a 37°C	38
Figura 4.2 - Comportamento do crescimento microbiano, pH e consumo de substratos nos cultivos de <i>B. subtilis</i> R14 realizados a 30°C	43
Figura 4.3 - Comportamento do crescimento microbiano, pH e consumo de substratos nos cultivos de <i>B. subtilis</i> R14 realizados a 37°C	44
Figura 4.4 - Crescimento microbiano e produção de compostos bioativos durante cultivos de <i>B. subtilis</i> R14 realizados a 30°C	46

Figura 4.5 – Crescimento microbiano e produção de compostos bioativos durante cultivos de <i>B. subtilis</i> R14 realizados a 37°C	47
Figura 4.6 – Produção máxima de esporos por <i>B. subtilis</i> R14 durante cultivos em diferentes condições de temperatura e aeração	51
Figura 4.7 – Atividade emulsificante do meio após cultivo de <i>B. subtilis</i> R14, antes do procedimento de separação dos seus componentes, do sobrenadante e do precipitado	53
Figura 4.8 – Atividade antimicrobiana do meio após o cultivo de <i>B. subtilis</i> R14, antes do procedimento de extração de compostos bioativos, do sobrenadante e do precipitado	53
Figura 4.9 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) realizada em placa de sílica de 0,25 mm de espessura (Merck, 60 F ₂₅₄)	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Linhagens de <i>B. subtilis</i> disponíveis comercialmente para controle de fitopatógenos	8
Tabela 3.1 – Composição do meio AN utilizado para manutenção de <i>B. subtilis</i> R14	28
Tabela 3.2 – Composição do meio YMA utilizado para manutenção de <i>A. tumefaciens</i>	29
Tabela 3.3 – Composição do meio utilizado para produção de lipopeptídeos por <i>B. subtilis</i> R14	29
Tabela 3.4 – Composição da solução de elementos traço	30
Tabela 3.5 – Composição dos meios utilizados para se avaliar o crescimento de <i>B. subtilis</i> R14 em anaerobiose	31
Tabela 4.1 - Valores dos tempos decorridos desde o início dos cultivos até a fase de declínio celular em todas as condições experimentais nos cultivos de <i>B. subtilis</i> R14	41
Tabela 4.2 – Valores máximos de atividades emulsificantes (E_{24}) atingidos durante a fase de crescimento de <i>B. subtilis</i> R14 para cada uma das situações analisadas	49

RESUMO

Muitas linhagens de *B. subtilis* produzem lipopeptídeos, que são compostos anfifílicos com atividades surfactante e antimicrobiana. A produção de lipopeptídeos, associada à capacidade de formação de esporos, contribui para a utilização comercial deste microrganismo no controle biológico de várias doenças de plantas. Neste trabalho, o crescimento, a produção de lipopeptídeos e a esporulação de *B. subtilis* R14 foram investigados em cultivos descontínuos sob diferentes condições de aeração e temperatura. Ensaios para crescimento em anaerobiose foram realizados em jarras de Gaspak a 37°C, utilizando-se meios de cultivos quimicamente definidos contendo glucose, glucose/piruvato ou glicerol, como fontes de carbono, e (NH₄)₂SO₄ e/ou NaNO₃, como fontes de nitrogênio. Para se investigar a produção de lipopeptídeos e esporos sob diferentes condições de aeração e temperatura, cultivos foram realizados em frascos Fernbach, em mesa agitadora. Um meio quimicamente definido, contendo glucose como fonte de carbono e (NH₄)₂SO₄ e NaNO₃ como fontes de nitrogênio, foi utilizado em todos os experimentos. Diferentes condições de aeração e temperatura foram testadas através de variações do volume do meio de cultivo (250 mL, 500 mL e 1000 mL), da agitação (150 rpm e 250 rpm) e da temperatura (30°C e 37°C). O crescimento celular foi acompanhado através da determinação do peso seco de células e por espectrofotometria. Os consumos de glucose e de nitrato foram determinados através de métodos espectrofotométricos. A formação de compostos com atividade antimicrobiana e com atividade surfactante foi acompanhada por métodos de difusão em agar e de poder emulsificante sobre hexano, respectivamente. A caracterização parcial dos compostos produzidos foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD). Em anaerobiose, *B. subtilis* R14 não cresceu em meio contendo glucose como única fonte de carbono. No entanto, o crescimento ocorreu em meios contendo glucose/piruvato ou glicerol como fontes de carbono. Nestes, maiores rendimentos em biomassa foram observados nos meios contendo NaNO₃. Em meios com diferentes condições de aeração e temperatura, a produção de composto com atividade antimicrobiana ocorreu em todos os cultivos durante a fase de crescimento, havendo degradação quando a fase de declínio foi atingida. Condições de restrição de oxigênio favoreceram a produção de composto com atividade antimicrobiana, entretanto, o aumento excessivo da restrição foi desfavorável à produção deste composto. O maior rendimento em produto com atividade antimicrobiana foi obtido a 30°C, ao passo que a maior produtividade ocorreu a 37°C. A produção de composto com atividade surfactante também ocorreu em todos os cultivos durante a fase de crescimento. A restrição de oxigênio e a temperatura de 30°C também favoreceram a produção deste composto. Em todas as situações analisadas, houve produção de esporos, mas a condição de maior temperatura e agitação (37°C e 250 rpm) favoreceu a esporulação. Ensaios em CCD revelaram que os compostos produzidos eram o lipopeptídeo surfactina e um outro com atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Several strains of *B. subtilis* produce lipopeptides, which are amphiphilic compounds with surfactant and antimicrobial activities. Production of lipopeptides, associated to the capacity of formation of spores, contributes to the commercial use of this microorganism in the biological control of several plant diseases. In this work, growth, lipopeptide production and sporulation of *B. subtilis* R14 were investigated in discontinuous cultivations under different aeration and temperature conditions. Experiments in anaerobiosis were carried out in Gaspak jars at 37°C, using synthetic media containing glucose, glucose/pyruvate or glycerol, as carbon sources, and (NH₄)₂SO₄ and/or NaNO₃ as nitrogen sources. To investigate lipopeptide and spore production under different aeration and temperature conditions, cultivations were carried out in Fernbach flasks in shaker. A synthetic medium, containing glucose as carbon source and (NH₄)₂SO₄ and NaNO₃ as nitrogen sources, was used in all experiments. Different aeration and temperature conditions were studied through variations of the volume of medium (250 mL, 500 mL and 1000 mL), of the agitation rate (150 rpm and 250 rpm) and of the temperature (30°C and 37°C). Cellular growth was accompanied through the determination of dry cell-weight and spectrofotometry. Glucose and nitrate consumptions were determined through spectrofotometric methods. Production of compounds with antimicrobial and surfactant activities was accompanied by agar diffusion method and by emulsificant power on hexan, respectively. The partial characterization of the compounds produced was accomplished by thin layer chromatography (TLC). In anaerobiosis, *B. subtilis* R14 did not grow in synthetic media containing glucose as the only carbon source. However, growth occurred in media containing glucose/pyruvate or glycerol as carbon sources, and higher biomass yields were observed in those media containing NaNO₃. In media with different aeration and temperature conditions, production of compounds with antimicrobial activity occurred during the growth phase in all cultivations, followed by degradation when the decline phase was reached. Restricted oxygen availability favored the production of compound with antimicrobial activity. However, the excessive increase of restriction was unfavorable to the production of this compound. The highest yield on product with antimicrobial activity was obtained at 30°C, while the highest productivity at 37°C. Production of compound with surfactant activity also occurred during the growth phase in all cultivations. Restricted oxygen availability and temperature of 30°C also favored the production of this compound. In all conditions, spores production was observed, but higher temperature and agitation (37°C and 250 rpm) favored sporulation. TLC revealed the production of the lipopeptide surfactin and of other compound with antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

Bacillus subtilis pertence ao gênero *Bacillus*, ordem Eubacteria, família Bacillaceae, que compreende um grupo de bactérias Gram-positivas (HOLT *et al.*, 1994; FRITZE, 2004) largamente utilizado em processos biotecnológicos industriais para produção de antibióticos, enzimas e produtos agroativos, entre outros produtos (ARBIGE *et al.*, 1993). Por muito tempo, *B. subtilis* foi considerado como sendo estritamente aeróbico. Estudos recentes, no entanto, mostraram a capacidade de crescimento desta espécie em anaerobiose, utilizando nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons ou, na ausência destes, por fermentação em meios de cultivo contendo glucose e piruvato (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; RAMOS *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2000) ou glicerol como fontes de carbono (NAKANO & ZUBER, 1998; CLEMENTS *et al.*, 2002). São microrganismos altamente resistentes em condições adversas presentes no meio ambiente, devido à capacidade de formação de esporos, que suportam extremos de temperatura e pH, dessecação, radiação UV e diversos produtos químicos (ex. pesticidas e fertilizantes) (DRIKS, 2004; PIGGOT & HILBERT, 2004).

Dentro da vasta maquinaria metabólica de *B. subtilis* de interesse biotecnológico, pode-se destacar a produção de lipopeptídeos, que são moléculas anfifílicas com propriedades biosurfactantes e antimicrobianas. Entre os lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*, encontram-se as surfactinas e as iturinas, ambos formados por uma cadeia carbônica e por um anel lactona composto de sete aminoácidos (STACHELHAUS *et al.*, 2002). A produção de lipopeptídeos, associada à capacidade de formação de esporos, contribui para a utilização comercial deste microrganismo no controle biológico de várias doenças de plantas (BACKMAN *et al.*, 1997; KLOEPPER, 1997; MELO, 1998; SCHISLER *et al.*, 2004; JACOBSEN *et al.*, 2004).

Estudos realizados no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, em colaboração com o Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, mostraram a eficácia de compostos bioativos de *B. subtilis* R14 contra linhagens fitopatogênicas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, produzidos utilizando-se meio de cultivo à base de glucose (MONTEIRO *et al.*, 2005) e meio de cultivo à base de melão (LUNA *et al.*, 2002). Outros estudos demonstraram, também, a atividade tanto *in vivo* (SANTOS, 2004) como *in vitro* (CARVALHO, 2005) contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha

aquosa do melão. Além disso, também foi observada a atividade antimicrobiana *in vitro* contra linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha-da-coroa em leguminosas; *Erwinia amylovora*, agente causal da ferrugem de fogo em cultivares de maçã, pêra, uva, etc.; *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana em plantações de membros da família Solanaceae, como batata, tomate, jiló, etc.; *Pectobacterium* spp., agente causal da canela preta em plantações de batata (CARVALHO, 2005). Em alguns destes trabalhos, foi demonstrada a existência de uma correlação entre a produção de biossurfactantes e a atividade antagônica destes compostos (SANTOS, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2005).

Com relação à fisiologia de *B. subtilis* R14, Carvalho (2005) realizou estudos sobre a esporulação e produção de lipopeptídeos em condições irrestritas e restritas de oxigênio em meios quimicamente definidos contendo glucose e diferentes fontes de nitrogênio. Em condições irrestritas de oxigênio, após um crescimento rápido e exaustão de glucose, uma esporulação eficiente é observada. Sob restrição de oxigênio, mas em presença de nutrientes essenciais, *B. subtilis* R14 produz compostos bioativos. A produção ocorre em meios mínimos contendo glucose como fonte de carbono e, como fontes de nitrogênio, sulfato de amônio, nitrato de sódio ou sulfato de amônio/nitrato de sódio.

Este trabalho tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a fisiologia de *B. subtilis* R14 em cultivos descontínuos e meio quimicamente definido contendo glucose, como fonte de carbono, e sulfato de amônio e nitrato de sódio, como fontes de nitrogênio e possível acceptor final de elétrons, respectivamente, com os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação do crescimento de *B. subtilis* R14 em condições de anaerobiose.
- Avaliação da influência da temperatura e restrição de oxigênio no crescimento e produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* R14.
- Caracterização parcial dos compostos bioativos produzidos por *B. subtilis* R14.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipopeptídeos Produzidos por *Bacillus subtilis*

Lipopeptídeos representam uma classe de surfactantes microbianos que tem atraído grande interesse na área científica. Tais compostos são largamente encontrados na natureza e são produzidos por uma larga variedade de microrganismos, destacando-se o gênero *Bacillus*. A característica estrutural destas moléculas é a presença de um ácido graxo específico ligado a uma porção de aminoácidos, o que lhes confere um caráter anfifílico (STACHELHAUS *et al.*, 2002). A produção de lipopeptídeos pelo gênero *Bacillus* merece atenção em função das múltiplas aplicações biológicas que possuem (CAMEOTRA, 2004; STEIN, 2005), em particular pela atividade antagônica contra diversos fitopatógenos.

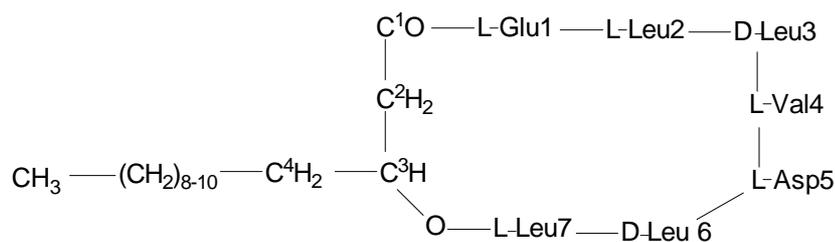
2.1.1 Surfactinas e Iturinas

Entre os lipopeptídeos sintetizados por linhagens de *B. subtilis*, a maioria pertence à classe dos lipopeptídeos cíclicos, geralmente formados por anéis de oito membros, sete dos quais são aminoácidos e o oitavo membro é um ácido graxo de conformação e tamanho de cadeia variável (Fig. 2.1). Entre os lipopeptídeos cíclicos, encontram-se o grupo das surfactinas e o grupo das iturinas, que inclui as iturinas A, C, D e E; bacilomicinas D, F e L; e micosubtilisina (AHIMOU *et al.*, 2000).

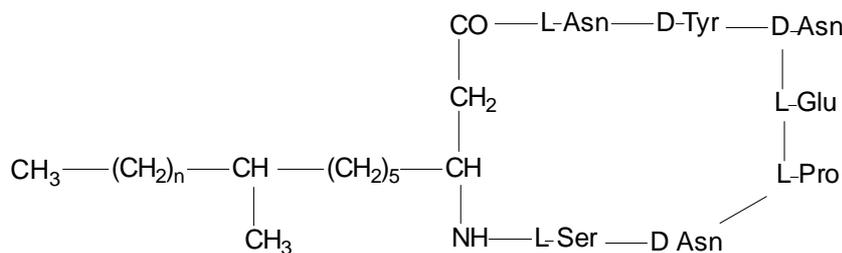
a) Surfactina

Arima *et al.* (1968) foram os primeiros autores que conseguiram purificar, cristalizar e caracterizar este composto produzido por *B. subtilis* ATCC 21332. A surfactina é classificada como lipopeptídeo macrolídeo, ácido, cíclico, com peso molecular de 1050 kDa, contendo um β -amino ácido graxo (geralmente um ácido β -hidroxidecanóico, como o ácido 3-hidróxi-13-metil tetradecanóico), ligado ao anel lactona através de uma ponte amida no resíduo de glutamato e de uma ligação éster no resíduo de D-Leu. A porção hidrofóbica é composta de uma cadeia carbônica variando de C13 a C16 e a porção hidrofílica é composta de Glu-Leu-

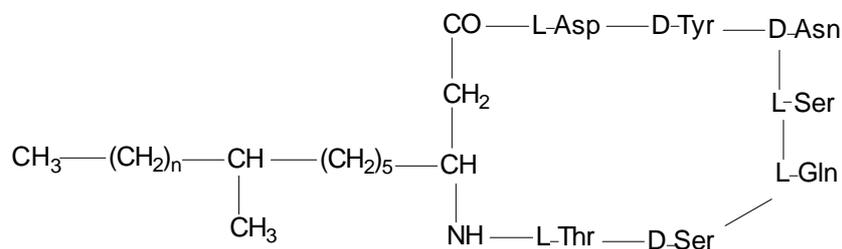
Leu-Val-Asp-Leu-Leu, dispostos na forma de um anel peptídico tipo lactona (ARIMA *et al.*, 1968; LANG, 2002; STACHELHAUS *et al.*, 2002). Devido à presença de resíduos de L-Glu e L-Asp, a surfactina apresenta duas cargas negativas em pH fisiológico, possuindo um pK entre 5,5-6,0, estando, em pH 5,5 completamente protonada (GRAU *et al.*, 1999). Morikawa *et al.* (2000), nas condições experimentais estudadas, determinou que o pK da surfactina era de aproximadamente 7,5.



(A)



(B)



(C)

Figura 2.1 – Lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*: (A) surfactina (adaptado de KOWALL *et al.*, 1998); (B) iturina A (adaptado de GRAU *et al.*, 2000); (C) bacilomicina L (adaptado de MOYNE *et al.*, 2004).

Este lipopeptídeo possui grande afinidade por cátions divalentes, principalmente Ca^{+2} e Mg^{+2} , como também Mn^{+2} , Ba^{+2} , Rb^{+2} e Li^{+2} , em pH alcalino e solução aquosa (THIMON *et al.*, 1993; MORIKAWA *et al.*, 2000; MULLIGAN, 2005), devido à interação entre eles e os grupos carboxila dos resíduos L-Glu e L-Asp (VASS *et al.*, 2001; MULLIGAN, 2005).

A estrutura quimérica da surfactina, tendo um grupo carboxila quelante, uma cadeia de ácido graxo com habilidade de formar micelas e a conformação flexível do anel lactona, pode explicar suas atividades biológicas (VASS *et al.*, 2001). Estes lipopeptídeos sintetizados por *B. subtilis* têm sido descritos como metabólitos secundários extracelulares de ação antifúngica (KOSARIC, 1993; KILIAN *et al.*, 2000; KONDOH *et al.*, 2001; STACHELHAUS *et al.*, 2002; MOITA *et al.*, 2005), antibacteriana (KOSARIC, 1993; MIRELES *et al.*, 2001; STACHELHAUS *et al.*, 2002), antiviral (KOSARIC, 1993; VOLLENBROICH *et al.*, 1997; KRACHT *et al.*, 1999; STACHELHAUS *et al.*, 2002), antimicoplasma (PAULI *et al.*, 1997), larvicida (DAS & MUKHERJEE, 2006), antitumoral (KAMEDA *et al.*, 1974); inibidora da fosfodiesterase dependente de cAMP (HOSONO & SUZUKI, 1983; VASS *et al.*, 2001); hemolítica (ARIMA *et al.*, 1968; BERNHEIMER & AVIGAD, 1970; KRACHT *et al.*, 1999; MORÁN *et al.*, 2002; SHALEL *et al.*, 2002; STACHELHAUS *et al.*, 2002), inibidora da formação de coágulos de fibrina (ARIMA *et al.*, 1968; KOSARIC, 1993; KIKUCHI & HASUMI, 2002), devido à ativação do plasminogênio (KIKUCHI & HASUMI, 2002); promotora de lise de esferoplastos e protoplastos (BERNHEIMER & AVIGAD, 1970); inibora da desnaturação de proteínas (ARIMA *et al.*, 1968); inibidora da resposta inflamatória, devido à supressão da fosfolipase A₂ plaquetária (KIM *et al.*, 1998); ativadora de macrófagos (MORIKAWA *et al.*, 2000; VASS *et al.*, 2001); inibidora da adesão de patógenos (SINGH & CAMEOTRA, 2004); e probiótica (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

b) Iturina

Assim como a surfactina, todos os membros deste grupo são classificados como sendo lipopeptídeos macrolídeos, ácidos, cíclicos, contendo β -amino ácidos graxos, geralmente com uma cadeia carbônica de C11 a C17 (mais comumente o ácido 12-metil tri ou tetradecanoíco), ligada por ponte amida a um resíduo de aminoácido no anel lactona. Estes lipopeptídeos compartilham uma seqüência comum: β -hidroxi ácidos graxos – L-Asp – D-Tyr

– D-Asn, sendo o aminoácido D-Tyr invariável (GRAU *et al.*, 2000; LANG, 2002; STACHELHAUS *et al.*, 2002).

Um dos principais membros desta classe de lipopeptídeos é a Iturina A (C₄₈H₇₄N₁₂O₁₄), que possui peso molecular de 1,042 kDa (YU *et al.*, 2002). É um metabólito termoestável, resistente a proteases e solúvel em metanol (BERNAL *et al.*, 2002).

2.2 Controle Biológico por *Bacillus subtilis*

Dentre os gêneros mais utilizados em biocontrole de doenças de plantas, o gênero *Bacillus*, mesmo não sendo superior em relação à sua atividade biocontroladora, tem grande vantagem em relação aos outros, devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem. Estas vantagens permitem a utilização deste microrganismo na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de folhas na forma de “sprays” (BACKMAN *et al.*, 1997; KLOEPPER *et al.*, 1997). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Grande parte dos trabalhos enfocando controle biológico pelo gênero *Bacillus* enfatiza a espécie *B. subtilis*, que é tipicamente uma rizobactéria, que se associa às raízes formando biofilmes com características ecológicas de simbiose (ASAKA & SHODA, 1996; DAVEY & O'TOOLE, 2000; KILIAN *et al.*, 2000; GARDENER, 2004). *B. subtilis* é uma das espécies biocontroladoras mais eficientes por apresentar atividade biológica contra uma série de microrganismos causadores de doenças de plantas, o que pode ser atribuído, em grande parte, à produção de lipopeptídicos ativos (ASAKA & SHODA, 1996; KILIAN *et al.*, 2000; KONDOH *et al.*, 2001; BERNAL *et al.*, 2002; BAIS *et al.*, 2004, GARDENER, 2004), bem como à habilidade de colonizar a planta.

Peypoux *et al.* (1999) e Kondoh *et al.* (2001) trabalharam com o meio fermentado de diferentes linhagens de *B. subtilis* para suprimir o crescimento do fungo que ataca plantações de batata, *Rhizoctonia solani*, tanto *in vivo* como *in vitro*. O meio após cultivo desta bactéria continha os compostos surfactina e iturina A, e foi comprovado que a taxa de crescimento do fungo, tanto *in vivo* como *in vitro*, foi diminuída quando em contato com a mistura dos dois

compostos. Bernal *et al.* (2002) utilizaram meio fermentado de cultivos de *B. subtilis*, contendo iturina A, e detectaram atividade contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, que ataca plantações de uvas e morangos, bem como *Erwinia carotovora* e *Ralstonia solanacearum*, ambos pragas de plantações de batatas. Wulff *et al.* (2002) detectaram atividade antimicrobiana no meio após cultivos de *B. subtilis* que continham os lipopeptídeos surfactina e iturina A, contra o fitopatógeno *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas. Cho *et al.* (2003) detectaram atividade antimicrobiana do meio após cultivos de *B. subtilis*, que continha iturina A, contra o fungo *Gloesporium gloesporioides*, causador da antracnose em vegetais. Moyne *et al.* (2004) relataram uma ação efetiva da bacilomicina D contra *Aspergillus flavus*, fungo produtor de flavotoxinas, que são extremamente danosas aos seres vivos.

No Departamento de Antibióticos da UFPE, estudos realizados com *B. subtilis* R14 demonstraram a produção de compostos bioativos efetivos no controle de *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, em cultivos realizados em meio à base de glucose (MONTEIRO *et al.*, 2005), bem como em meio à base de melaço (LUNA *et al.*, 2002). Monteiro *et al.* (2005) observaram que a atividade antimicrobiana foi concomitante com a produção de lipopeptídeos biosurfactantes, comprovado pela diminuição da tensão superficial do meio. Santos (2004) demonstrou a atividade antimicrobiana de *B. subtilis* R14, tanto *in vitro* como *in vivo*, contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha aquosa do melão. A efetividade do biocontrole foi atingida tanto com o líquido livre de células como na presença destas. Carvalho (2005) demonstrou a atividade antimicrobiana *in vitro* destes compostos contra *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal da galha-da-coroa em leguminosas; *Erwinia amylovora*, agente causal da ferrugem de fogo em cultivares de maçã, pêra, uva, etc.; *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana em plantações de membros da família Solanaceae, como batata, tomate, jiló, etc.; *Pectobacterium* spp., agente causal da canela preta em plantações de batata.

Várias linhagens de *B. subtilis* já são comercializadas como agentes de controle de diversos fitopatógenos. Alguns destes produtos são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Linhagens de *B. subtilis* disponíveis comercialmente para controle de fitopatógenos.

Produto	Organismo-alvo	Referência
Rhiz o-Plus	<i>Alternaria</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.	SANTOS, 2004;
Kodiak	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythum</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. (agentes causadores de podridões radiculares)	HANDELSMAN & EMMERT, 1999; SCHISLER <i>et al.</i> , 2004; BREWER & LARKIN, 2005
Subtilex	<i>Rhizoctonia</i> spp. (patógeno de feijão)	SANTOS, 2004
Hi Stick N/T	<i>Fusarium</i> spp. e <i>Rhizoctonia</i> spp. (patógenos de feijão)	SANTOS, 2004
Serenade	<i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> e <i>Monilinia vaccinii corimbosi</i>	BAIS <i>et al.</i> , 2004; SCHISLER <i>et al.</i> , 2004 ; NGUGI <i>et al.</i> , 2005
FZB24	Patógenos de plantações de batata	KILIAN <i>et al.</i> , 2000

2.2.1 Atividade Antimicrobiana

Estudos sobre o mecanismo de ação de iturina A mostram que a mesma se comporta como uma molécula anfifílica não-iônica que tem como sítio alvo de ação estruturas fosfolipídicas (fosfolipídeos) e esteróis e induz a abertura de poros/canais iônicos nas membranas de células de fungos e leveduras, aumentando a permeabilidade e condutância a íons, principalmente K^+ , causando um desequilíbrio eletroquímico entre os meios intra e extracelular (MAGET-DANA & PEYPOUX, 1994; GRAU *et al.*, 2000; LANG, 2002; SINGH & CAMEOTRA, 2004).

A interação da iturina A com fosfolipídeos é facilitada pela ação de outros lipopeptídeos presentes no meio, possivelmente a surfactina. É demonstrado que as atividades antifúngica e hemolítica destes agentes são incrementadas pelo aumento do número de átomos de carbono das cadeias de ácidos graxos, presumivelmente devido à aumentada interação com membranas biológicas. A iturina A forma agregados micelares com organização lamelar ou

pequenas vesículas fechadas que solubilizam as membranas biológicas do microrganismo alvo através de interações hidrofóbicas (GRAU *et al.*, 2000).

Com relação à surfactina, acredita-se que sua atividade antimicrobiana seja consequência direta da interação forte e profunda deste lipopeptídeo com sua membrana alvo e de sua ação sobre a estabilidade de bicamadas (CARRILLO *et al.*, 2003). Estas interações são mais intensas no caso de fosfolipídeos com cadeia hidrocarbônica semelhante à da surfactina em relação ao número de carbonos. A surfactina forma “clusters” com os fosfolipídeos, estabelecendo domínios de surfactina dentro da bicamada (KNOBLICH *et al.*, 1995; GRAU *et al.*, 1999). Esta molécula pode ainda formar, nas bicamadas, agregados micelares com organização lamelar ou pequenas vesículas fechadas, que solubilizam a membrana biológica, atuando como um detergente nesta estrutura (KNOBLICH *et al.*, 1995; GRAU *et al.*, 1999; CARRILLO *et al.*, 2003; HEERKLOTZ *et al.*, 2004). A forma ionizada da surfactina se insere mais profundamente na bicamada quando Ca^{+2} está presente no meio, uma vez que um complexo surfactina- Ca^{+2} é formado (KNOBLICH *et al.*, 1995; KOWALL *et al.*, 1998; GRAU *et al.*, 1999). Ao penetrar na bicamada, o anel lactona polar se insere na interface hidrofóbica da membrana desestabilizando-a através da formação de poros condutores de íons, que compromete o equilíbrio eletroquímico da membrana, explicando a possível ação antimicrobiana destas moléculas (CARRILLO *et al.*, 2003; HEERKLOTZ *et al.*, 2004; SINGH & CAMEOTRA, 2004).

A surfactina sozinha não inibe o crescimento de agentes fitopatogênicos, mas acredita-se que aumenta significativamente a atividade antifúngica da iturina A, através de uma relação sinérgica (HIRAOKA *et al.*, 1992; MAGET-DANA *et al.*, 1992; THIMON *et al.*, 1992; RAZAFINDRALAMBO *et al.*, 1993), provavelmente devido à atividade citolítica da surfactina, ligada à sua potente propriedade surfactante (ARIMA *et al.*, 1968), que enfraquece (solubiliza) a membrana celular e facilita o ataque da iturina A (MAGET-DANA *et al.*, 1992; PHAE *et al.*, 1992).

O efeito sinérgico da surfactina nas propriedades biológicas da iturina A mostra que a combinação de um poderoso biosurfactante e um composto antifúngico poderia ser vantajosa em algumas aplicações biotecnológicas (MAGET-DANA *et al.*, 1992), bem como no controle de pragas em lavouras, tornando-se uma combinação interessante para a agroindústria.

2.2.2 Atividade Surfactante

Biossurfactantes são compostos anfífilicos possuindo uma porção hidrofóbica, que pode ser formada por ácidos graxos de cadeia longa, hidroxí-ácidos graxos ou α -alquil- β -hidroxí-ácidos graxos, e uma porção hidrofílica, que pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeos cíclicos, fosfato, ácidos carboxílicos ou álcool (KOSARIC, 1993; MULLIGAN, 2005). Pertencente a esta classe de compostos, encontra-se a surfactina, conhecida por ser um poderoso biossurfactante (FIECHTER, 1992; KOSARIC, 1993; DELEU *et al.*, 1999; BANAT *et al.*, 2000; LANG, 2002).

Biossurfactantes apresentam vantagens sobre surfactantes sintetizados quimicamente por possuírem menor toxicidade; serem biodegradáveis; serem efetivos a extremos de temperatura, pH e salinidade; possuírem síntese possível a partir de substratos renováveis; capacidade de serem modificados por técnicas de engenharia genética, técnicas biológicas e bioquímicas (FIECHTER, 1992; KOSARIC, 1993; BANAT, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002; CAMEOTRA & MAKKAR, 2004; MULLIGAN, 2005).

Na agricultura, a surfactina pode ser útil na hidrofilização de metais pesados, bem como na melhor distribuição de fertilizantes, herbicidas e pesticidas no solo, entrando na composição de alguns pesticidas organofosforados imiscíveis, devido a sua ação emulsificante (BANAT *et al.*, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002). É relatado que este biossurfactante aumenta a taxa de biodegradação de pesticidas químicos no solo (BANAT *et al.*, 2000; MULLIGAN, 2005), bem como remove metais pesados de ambientes através de sorção (ligação do metal pesado à porção aniônica da molécula por interações eletrostáticas) e complexação destes em micelas (MULLIGAN, 2005).

Em comparação a outros lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*, como a iturina A, a surfactina apresenta maiores propriedades biossurfactantes (DELEU *et al.*, 1999; MORIKAWA *et al.*, 2000), devido à presença de dois grupos carboxila na cadeia peptídica da surfactina, enquanto a iturina A possui dois grupos hidroxila. Isto sugere que os grupos carboxila garantem maior solubilidade da surfactina na água em relação à iturina, o que lhe garante maior atividade surfactante em soluções aquosas (MORIKAWA *et al.*, 2000).

2.2.3 Formação de Biofilmes

Devido à estrutura anfifílica dos lipopeptídeos, estas moléculas podem influenciar a adesividade de *B. subtilis*, permitindo a formação de biofilmes por estes microrganismos, por se adsorverem à superfície destas bactérias quando são excretados, promovendo mudanças na hidrofobicidade da superfície bacteriana (AHIMOU *et al.*, 2000; KISINGER *et al.*, 2003; STEIN, 2005). Portanto, se a superfície bacteriana está mais hidrofílica, lipopeptídeos provavelmente são orientados de tal modo que a cadeia hidrocarbônica seja exposta, tornando a superfície mais hidrofóbica. A orientação é invertida se a mesma está mais hidrofóbica. Com estas modificações, a adesão destes microrganismos a substratos sólidos, através de interações hidrofóbicas, é regulada. (AHIMOU *et al.*, 2000; KISINGER *et al.*, 2003).

Bais *et al.* (2004), trabalhando com biocontrole de *B. subtilis* contra *Pseudomonas syringae*, que infecta raízes de *Arabidopsis*, observaram que há formação de um biofilme nas raízes do vegetal somente quando estas são inoculadas com linhagens de *B. subtilis* capazes de sintetizar surfactina. Ao mesmo tempo, observou-se que, quanto maior a secreção deste composto, menor a densidade populacional de *P. syringae* nas raízes de *Arabidopsis*, devido talvez à ação bactericida deste antibiótico peptídico.

2.3 Metabolismo e Fisiologia de *Bacillus subtilis*

2.3.1 Vias Centrais de Catabolismo

B. subtilis é uma bactéria quimioheterotrófica facilmente isolada de amostras de solos, que são habitats ricos em uma variedade de carboidratos, incluindo polissacarídeos derivados de plantas, animais e outros 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, 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 (TORTORA *et al.*, 2000).

B. subtilis tem como fonte preferencial de carbono a glucose. Se este microrganismo é colocado em um meio contendo este monossacarídeo e uma fonte de carbono que não seja rapidamente metabolizável, há uma repressão dos genes relacionados com o transporte e catabolismo desta última fonte e indução das vias catabólicas e de transporte da glucose. Estes eventos de repressão/desrepressão ocorrem através de uma proteína chamada CcpA. Quando a glucose se exaure, os genes relacionados com o transporte e catabolismo da fonte de carbono secundária são desreprimidos (BRÜCKNER & TITGEMEYER, 2002; DEUTSCHER *et al.*, 2002; BLENCCKE *et al.*, 2003).

B. subtilis cataboliza a glucose através das vias glucolítica e pentose fosfato (Fig. 2.2). O piruvato formado pode ser oxidado a acetil coenzima A (acetil-CoA) ou pode ser usado para regenerar NAD^+ em fermentação, gerando diversos produtos. Acetil-CoA pode ser completamente oxidada no ciclo de Krebs, com geração de equivalentes redutores doadores de elétrons para geração de energia na cadeia transportadora de elétrons (SONENSHEIN, 2002). Além disso, a energia da ligação tioéster do acetil-CoA pode ser direcionada para fosforilação ao nível de substrato para formar acetato. *B. subtilis* não possui a via do glioxilato, portanto não podem crescer em meio com fonte C2 de carbono (DEUTSCHER *et al.*, 2002).

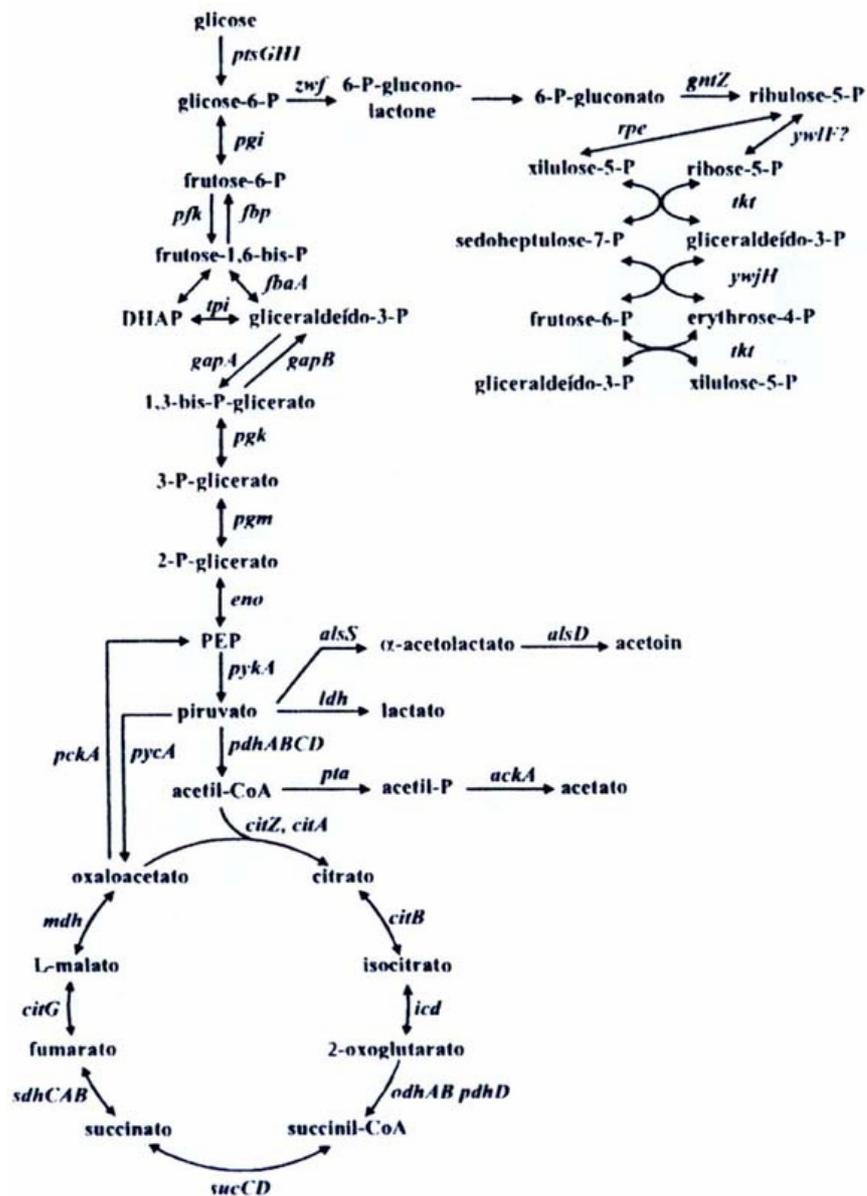


Figura 2.2 – Vias centrais do metabolismo do carbono em *B. subtilis* (adaptado de DEUTSCHER *et al.*, 2002).

2.3.2 Metabolismo Anaeróbico

a) Respiração

B. subtilis era considerado como um microrganismo estritamente aeróbico, mas estudos recentes mostraram que este também cresce em anaerobiose, utilizando nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons ou por fermentação na ausência destes. As reduções de nitrato e nitrito são catalisadas pelas enzimas nitrato e nitrito redutases, cujos genes são transcritos sob estímulo da limitação de O₂ (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; RAMOS *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2000). A redução de nitrato gera nitrito e ATP através da força próton-motriz gerada pelo deslocamento de elétrons pela cadeia transportadora. O nitrito sofre redução reoxidando o NADH e gerando amônio (NAKANO & ZUBER, 2002).

B. subtilis não cresce em anaerobiose em meio mínimo de cultivo contendo glucose como única fonte de carbono, mesmo na presença de nitrato. Este comportamento ocorre possivelmente em decorrência da ineficiência de algumas enzimas da via glucolítica em condições anaeróbicas (NAKANO & ZUBER, 1998). No entanto, quando piruvato é adicionado em altas concentrações, o microrganismo inicia um crescimento anaeróbico por respiração se o nitrato estiver presente (NAKANO & ZUBER, 1998). Autores afirmam que cultivos anaeróbicos na presença de piruvato como fonte de carbono apresentam crescimentos microbianos tanto por respiração anaeróbica como por fermentação, dependendo da presença ou ausência de nitrato no meio de cultura, respectivamente (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; RAMOS *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2000). O crescimento microbiano em anaerobiose na presença de piruvato ocorre porque a presença deste substrato desreprime o gene que codifica a enzima piruvato desidrogenase (PDH), que catalisa a síntese de acetil-CoA a partir do piruvato (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; SONENSHEIN *et al.*, 2002). Na presença de nitrato, o acetil-CoA sintetizado entra no ciclo de Krebs, equivalentes redutores são gerados, havendo, posteriormente, redução de nitrato a nitrito, correspondendo a uma respiração anaeróbica, que confere um rendimento energético de 36 a 38 ATP (TOTORA *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2000; SONENSHEIN *et al.*, 2002).

É também relatado que *B. subtilis* cresce em anaerobiose na presença de glicerol somente se houver nitrato no meio de cultivo (CLEMENTS *et al.*, 2002). Como o glicerol é

uma fonte de carbono não fermentescível, a única via de crescimento utilizando este substrato é a partir da respiração anaeróbica, quando nitrato está presente no meio (NAKANO & ZUBER, 1998; CLEMENTS *et al.*, 2002).

b) Fermentação

Na ausência de aceptores alternativos de elétrons, *B. subtilis* cresce por fermentação, cujos produtos, identificados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), são etanol, lactato, acetoína, 2,3-butanediol e acetato. A chave deste processo é a reoxidação de NADH, que é produzido durante a glucólise. A regeneração de NAD⁺ é realizada na conversão de piruvato a lactato e acetoína a 2,3-butanediol por descarboxilação do acetolactato, bem como na produção de etanol via acetyl-CoA (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER., 1998; RAMOS *et al.*, 2000) (Fig. 2.3). O rendimento energético do processo é pobre, correspondendo a 2 ATP e a energia é gerada por fosforilação em nível de substrato (NAKANO *et al.*, 1998; TORTORA *et al.*, 2000).

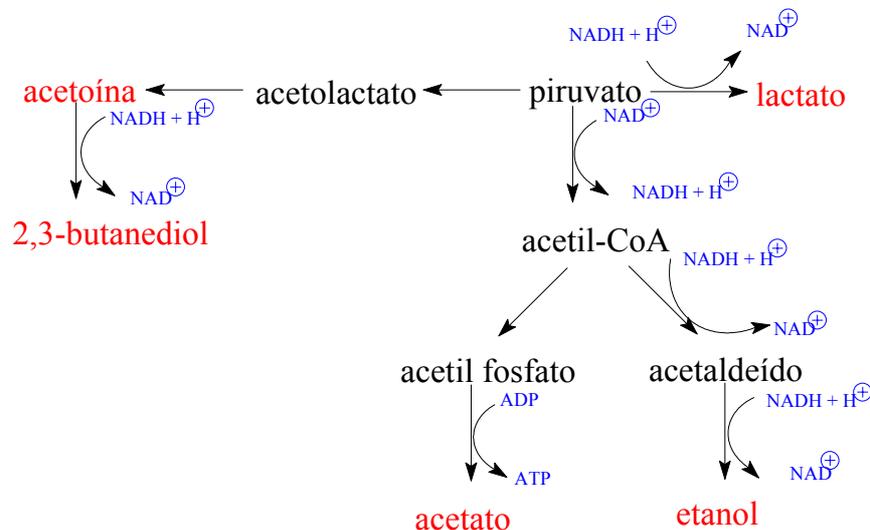


Figura 2.3 – Produtos resultantes do processo fermentativo em *B. subtilis* (Modificado de NAKANO & ZUBER, 2002).

c) Regulação

Entre as modificações ocorridas durante o metabolismo anaeróbico, estão:

- Inibição da expressão dos genes *citZ* e *citA*, que codificam as enzimas aconitase e citrato sintase, respectivamente, do ciclo de Krebs (NAKANO *et al.*, 1998);
- Indução da síntese e utilização de ferro pelo microrganismo (BLENCKE *et al.*, 2003);
- Estimulação da transcrição de genes relacionados com enzimas de respiração utilizando nitrato como aceptor final de elétrons (YE *et al.*, 2000);
- Indução de genes requeridos para a produção de metabólitos secundários, tais como antibióticos (NAKANO & ZUBER, 2002);
- Inibição de genes relacionados com a esporulação (SPILIMBERGO *et al.*, 2003).

2.3.3 Metabolismo Secundário: síntese de lipopeptídeos e regulação gênica

A porção peptídica de antibióticos peptídicos e lipopeptídicos pode ser sintetizada por um dos dois mecanismos básicos: ribossomal e não-ribossomal (STACHELHAUS *et al.*, 2002).

A síntese ribossomal (Fig. 2.4) é a clássica e envolve a transcrição do DNA a mRNA, que serve de molde para a tradução, onde os aminoácidos são sintetizados e posteriormente ligados formando os peptídeos (ALBERTS *et al.*, 1997).

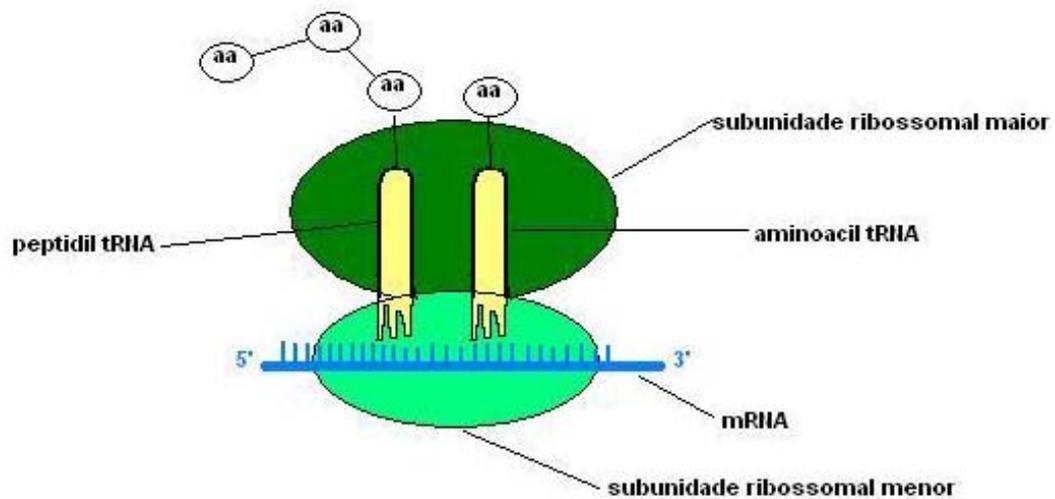


Figura 2.4 – Síntese de peptídeos por via ribossomal (Modificado de ALBERTS *et al.*, 1997).

A síntese não-ribossomal de alguns lipopeptídeos, também chamada de multienzimática, multidomínio ou “tiotemplate”, se caracteriza pela presença de um grande complexo de subunidades enzimáticas, conhecidas como multienzimas ou polienzimas organizadas em módulos, cada um destes sendo um conjunto de polipeptídeos, capazes de catalisar um número de reações bioquímicas, incluindo ativação de aminoácidos (reações de adenilação e hidrólise de ATP), formação de ligações peptídicas (reações de condensação), que completam um ciclo de alongação da cadeia (BESSON & MICHEL, 1992; STACHELHAUS *et al.*, 2002; STEIN, 2005) (Fig. 2.5). O término da síntese pode envolver ciclização, dimerização ou trimerização de pequenos intermediários peptídicos ou transferência do peptídeo para um grupo funcional, como os lipídeos, formando os lipopeptídeos (STACHELHAUS *et al.*, 2002). A desvantagem deste mecanismo é a menor especificidade das reações de ativação de aminoácidos em relação ao ribossomal (KOSARIC, 1993).

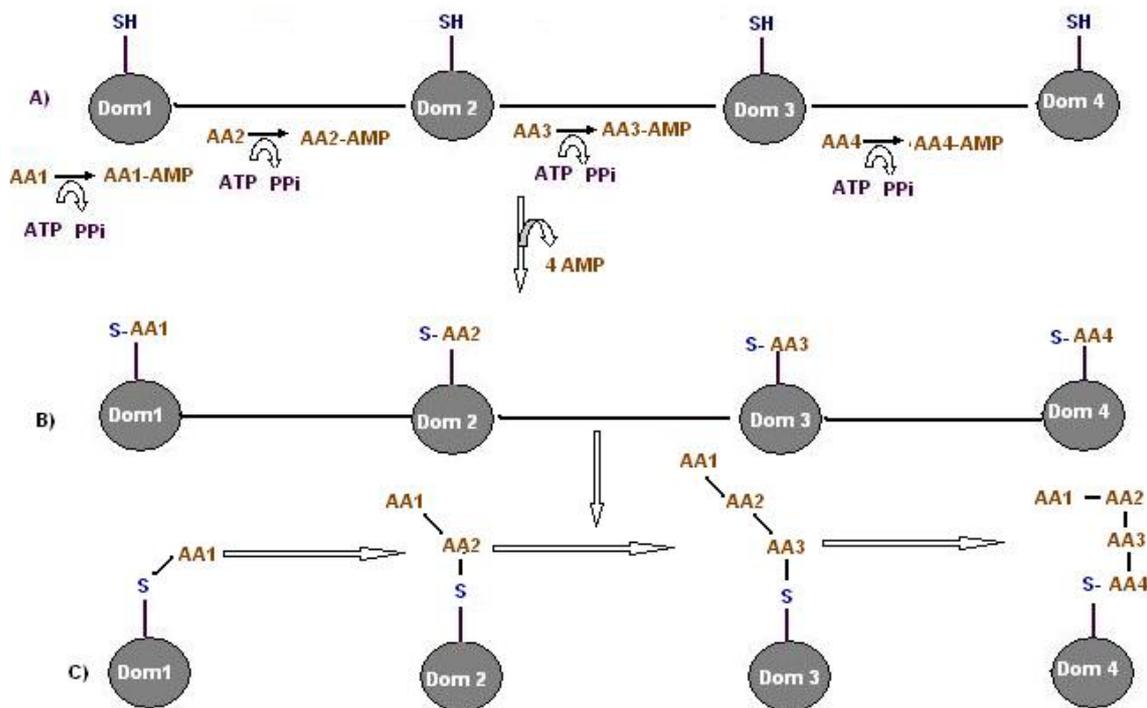


Figura 2.5 – Mecanismo multienzimático de produção de lipopeptídeos. (A) ativação dos aminoácidos com perda de uma molécula de ATP, formando acil-adenilatos; (B) os acil-adenilatos formam carboxil-tioésteres à subunidade do complexo com perda de AMP; (C) formação da cadeia polipeptídica através de ligação covalente entre os aminoácidos ligados à molécula de enxofre da subunidade do complexo. Dom = subunidade do complexo enzimático (Modificado de STACHELHAUS *et al.*, 2002).

A síntese de lipopeptídeos pode ocorrer por uma das quatro formas seguintes (KOSARIC, 1993):

- Síntese *de novo*, independente, das porções hidrofóbica e hidrofílica com posterior ligação.
- Síntese *de novo* da porção hidrofóbica e síntese dependente do substrato da porção hidrofílica com posterior ligação.
- Síntese *de novo* da porção hidrofílica e síntese dependente do substrato da porção hidrofóbica com posterior ligação.
- Síntese dependente do substrato de ambas as porções com posterior ligação.

a) Surfactina

A síntese da cadeia peptídica da surfactina ocorre pelo método “tiotemplate”, que é comprovado por ensaios realizados com cloranfenicol (antibiótico que inibe a síntese ribossomal de proteínas). A síntese enzimática deste lipopeptídeo requer ATP, Mg^{+2} , precursores, fontes de carbono e nitrogênio, sais de ferro (Fe^{+3}) e manganês, sendo estes dois últimos em concentração milimolar. O componente ácido graxo entra na molécula na forma de acetato proveniente do acetil-CoA e os aminoácidos sob a forma de L-isômeros, podendo sofrer posterior racemização (COOPER *et al.*, 1981; KLEINKAUF *et al.*, 1986; SHEPPARD & COOPER, 1991; KOSARIC, 1993).

Três *loci* cromossômicos (*sfp*, *srfA* e *srfB*) são envolvidos na síntese (STACHELHAUS *et al.*, 2002), cujos genes estão organizados em conjuntos de unidades de transcrição (NAKANO *et al.*, 1988).

O principal operon envolvido na síntese é o *srfA*, composto por três subunidades: *srfA-A* (395 kDa); *srfA-B* (401 kDa) e *srfA-C* (144 kDa), que possuem domínios carreadores de peptídeos (PCP), de epimerização (E), de condensação (C), de adenilação (A) e tiolesterase (TE) (Fig. 2.6) (BRUNER *et al.*, 2002; STEIN, 2005). O primeiro aminoácido a ser incorporado na cadeia está ligado no primeiro domínio PCP da subunidade *srfA-A* e já possui a porção ácido graxo incorporada. Daí, então, liga-se ao aminoácido ligado no módulo seguinte, formando um lipodipeptídeo e, posteriormente, cada lipopeptídeo em crescimento é transferido para o próximo módulo através da catálise de uma PCP peptidil transferase, de forma que cada módulo contém um lipopeptídeo com um aminoácido a mais que o anterior. Antes de passar de uma subunidade para outra, o lipopeptídeo em crescimento sofre reações de condensação, adenilação e epimerização e as ligações peptídicas são formadas por transpeptidação. Enfim, no módulo 7 (subunidade *srfA-C*), o lipoheptapeptídeo é transferido por uma PCP-fosfopanteteiniltransferase para o domínio TE, estabelecendo uma ligação TE-O-heptapeptídeo (BRUNER, *et al.*, 2002). A molécula sofre, então, uma ciclização (macrolactonização), que ocorre pelo ataque nucleofílico da hidroxila da porção ácido graxo sob a carbonila do primeiro aminoácido (ligado à O-Ser-TE) (BRUNER *et al.*, 2002; STEIN, 2005).

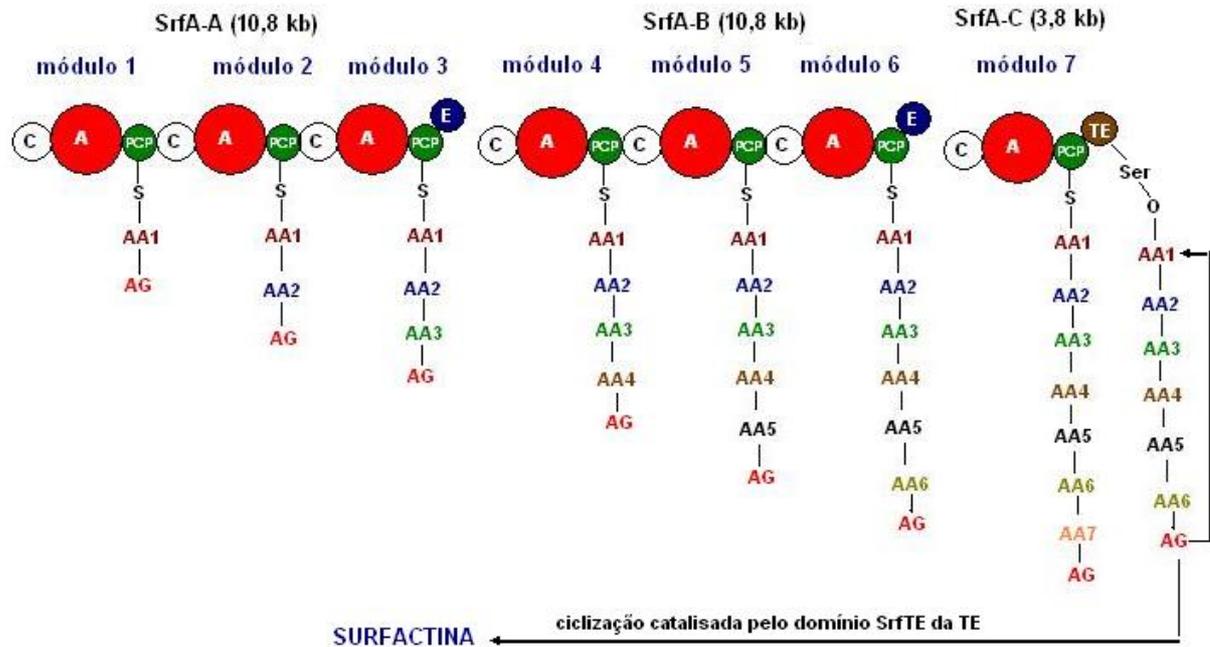


Figura 2.6 – Síntese de surfactina. C – Domínio de condensação; A – Domínio de adenilação; PCP – Domínio carreador de peptídeos; E – Domínio de epimerização; TE – Tiolesterase; AA – Aminoácido; AG – Ácido graxo (Modificado de BRUNER *et al.*, 2002).

Uma vez sintetizada, a surfactina é excretada por difusão passiva pela membrana citoplasmática bacteriana (STEIN, 2005).

Estudos químicos, realizados com a utilização de CLAE de fase reversa e Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética (ERNM) e de Massa (EM), têm demonstrado a presença de pelo menos seis isoformas ou isômeros e algumas séries homólogas para a surfactina, que aparecem dependendo do estado nutricional e das condições ambientais aos quais estão submetidos os microrganismos produtores. A principal isoforma é a [Leu⁷]-surfatina, embora as formas [Ile⁷] e [Val⁷]-surfactinas também sejam normalmente encontradas, mas em menores quantidades (PEYPOUX *et al.*, 1991; PEYPOUX & MICHEL, 1992; KOWAL *et al.*, 1998; WEI & CHU, 1998; DELEU *et al.*, 1999; AKPA *et al.*, 2001; LANG, 2002).

Quanto à fase onde ocorre a produção de surfactina, alguns autores relatam que esta ocorre no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento (NAKANO *et al.*, 1989 e 1991a; KIM *et al.*, 2001). Besson & Michel (1992) relatam que em *B. subtilis*, a

surfactina já é sintetizada, ainda que em pequenas concentrações, na fase logarítmica de crescimento.

b) Iturina

A síntese de iturina A é geneticamente regulada pelo operon iturina A, que possui 38 kb e é composto de quatro genes: *ituD*, *ituA*, *ituB* e *ituC*. O gene *ituD* codifica a enzima malonil CoA transacetilase; o segundo gene, *ituA*, codifica uma proteína de 449 kDa que possui três funções: ácido graxo sintetase, aminoácido transferase e peptídeo sintetase. Os terceiro e quarto genes, *ituB* e *ituC*, codificam peptídeos sintetases com 609 e 297 kDa, respectivamente. Todas essas enzimas são necessárias para síntese de iturina A, visto que atuam na inserção das porções ácido graxo e peptídeo na molécula (TSUNGE *et al.*, 2001).

Quanto à fase de crescimento microbiano, a iturina é produzida principalmente na fase estacionária por algumas espécies de *Bacillus* (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; YU *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2003).

2.3.4 Esporulação: mecanismo e regulação gênica

a) Mecanismo de formação de esporos

Além do crescimento vegetativo, *Bacillus* pode apresentar um estilo 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 disparar este processo (WHITE, 2000; REAL & HENRIQUES, 2001).

A estrutura do esporo é completamente diferente da célula vegetativa que lhe deu origem, o que caracteriza um processo de diferenciação celular (WHITE, 2000). Os esporos de *Bacillus* apresentam uma morfologia elipsóide (FRITZE, 2004) com uma composição enzimática e química que lhes confere resistência a condições pouco propícias ao crescimento vegetativo, como ausência de nutrientes, baixa disponibilidade de água, extremos de temperatura e pH, produtos químicos (DRIKS, 2004; PIGGOT & HILBERT, 2004). O conteúdo de água diminui de 75-80%, nas células vegetativas, para 15-20% nos esporos,

promovendo uma situação de baixa atividade metabólica (dormência) comparada à das células vegetativas. Esta perda de água é necessária para garantir a resistência do esporo (TORTORA *et al.*, 2000; WHITE, 2000).

O esporo é envolvido por uma capa protetora com múltiplas camadas, constituída de proteínas, glicoproteínas, peptidoglicanas e ácido piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico, DPA) (TORTORA *et al.*, 2000; WHITE, 2000, DRIKS, 2004). Esta capa protetora confere resistência ao microrganismo, principalmente a compostos químicos, calor, radiação por longo tempo. Ao mesmo tempo em que ela protege o esporo de compostos tóxicos de elevado peso molecular, possui microporos que permitem a entrada de pequenos nutrientes, necessários para o início da germinação do esporo quando condições favoráveis estiverem presentes (DRIKS, 2002).

Durante cultivos microbianos, observa-se que espécies de *Bacillus* freqüentemente formam esporos no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento, quando é observada depleção da fonte de nutriente (CARVALHO, 2005; DWORKIN & LOSICK, 2005).

Em linhas gerais, o processo de esporulação pode ser descrito em etapas (Fig. 2.7):

- O cromossomo bacteriano recém-replicado e uma pequena porção do citoplasma são isolados por um septo (divisão assimétrica da célula), que corresponde à invaginação da membrana plasmática (TORTORA *et al.*, 2000; PIGGOT & HILBERT, 2004; DWORKIN & LOSICK, 2005);
- O septo do esporo torna-se uma membrana dupla que circunda o cromossomo e o citoplasma (TORTORA *et al.*, 2000; PIGGOT & HILBERT, 2004);
- Camadas espessas de peptidoglicana se depositam entre as membranas do esporo (TORTORA *et al.*, 2000; DRIKS, 2004);
- Proteínas (SpoIVA e CotE) são dispostas em camadas formando a capa protetora do esporo (DRIKS, 2002 e 2004);
- DPA é transportado para o esporo, onde é quelado por cátions, principalmente Ca^{+2} . Este ácido é responsável pela resistência destas estruturas a elevadas temperaturas (VEPACHEDU & SETLOW, 2004). Durante a esporulação, uma bomba de Ca^{+2} dependente de ATP é ativada no esporo para permitir acúmulo deste cátion, proveniente do meio externo ou da célula mãe, havendo a formação do complexo Ca^{+2} -DPA (RAEYMAEKERS *et al.*, 2002);

- A maior parte da água presente no citoplasma da célula é eliminada no momento em que a esporulação está completa, formando um centro altamente desidratado no esporo, que contém apenas DNA (protegido por proteínas especializadas), pequenas quantidades de RNA, ribossomos, enzimas e DPA. Esta estrutura permanece metabolicamente inerte até que as condições ambientais se tornem adequadas, quando então ocorrerá o crescimento vegetativo (TORTORA *et al.*, 2000; DRIKS, 2004);
- Com o final do processo, duas estruturas podem ser identificadas: o esporo e a célula mãe (PIGGOT & HILBERT, 2004; DWORKIN & LOSICK, 2005), que posteriormente sofre morte celular programada, permanecendo apenas o esporo no ambiente (PIGGOT & HILBERT, 2004).

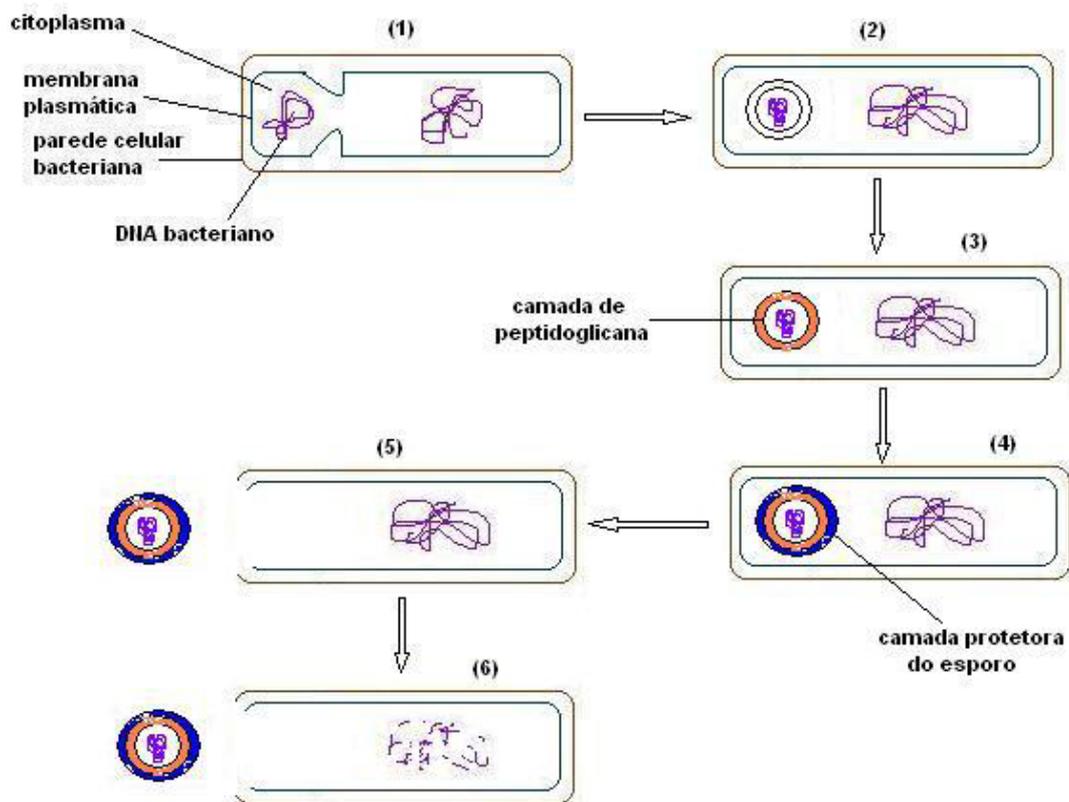


Figura 2.7 – Mecanismo de formação de esporos em *B. subtilis*. (1) O septo do esporo começa a isolar o DNA recém-replicado e uma pequena porção do citoplasma; (2) A membrana plasmática começa a circundar o DNA e, juntamente com o septo, forma um pré-esporo com uma membrana dupla; (3) Deposição de uma camada de peptidoglicana entre as membranas do pré-esporo; (4) Formação da camada protetora do esporo pelas proteínas SpoIVe e CotE; (5) Liberação do esporo no ambiente; (6) Fragmentação do DNA da célula mãe (Modificado de TORTORA *et al.*, 2000 e DRIKS, 2002).

b) Regulação gênica

As bactérias esporulantes não fabricam as proteínas relacionadas com a esporulação constitutivamente, sendo o seu nível de síntese ajustado de acordo com as condições externas (ALBERTS *et al.*, 1997). O processo de esporulação funciona como um circuito de transdução cujos sinais, positivos ou negativos, influenciam no desenvolvimento da célula, através de regulação protéica. Portanto, é em um 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, continua seu crescimento vegetativo ou inicia a esporulação (WHITE, 2000). A restrição nutricional (privação de purinas, fontes de carbono e nitrogênio), por exemplo, promove expressão de genes relacionados com a esporulação (NAKANO *et al.*, 1991b).

Algumas proteínas atuam regulando a esporulação (Fig. 2.8):

- **CodY** – regula positivamente, estimulando a transcrição de genes responsáveis pela fosforilação de SpoOF, um dos fatores responsáveis pela esporulação, em resposta a níveis críticos de guanina (GTP). Na presença de GTP, este se complexa com CodY, inibindo alguns fatores da esporulação (STROHL, 1997; REAL & HENRIQUES, 2001; PIGGOT & HILBERT, 2004).
- **RapA, B, E** – regulam negativamente, estimulando a inibição da proteína SpoOF (PEREGO, 1997; PIGGOT & HILBERT, 2004).
- **PhrA** – inibe a ação da RapA (PEREGO, 1997).
- **Sda** – regula negativamente, reprimindo fatores da esporulação em resposta a danos no DNA (REAL & HENRIQUES, 2001; PIGGOT & HILBERT, 2004).

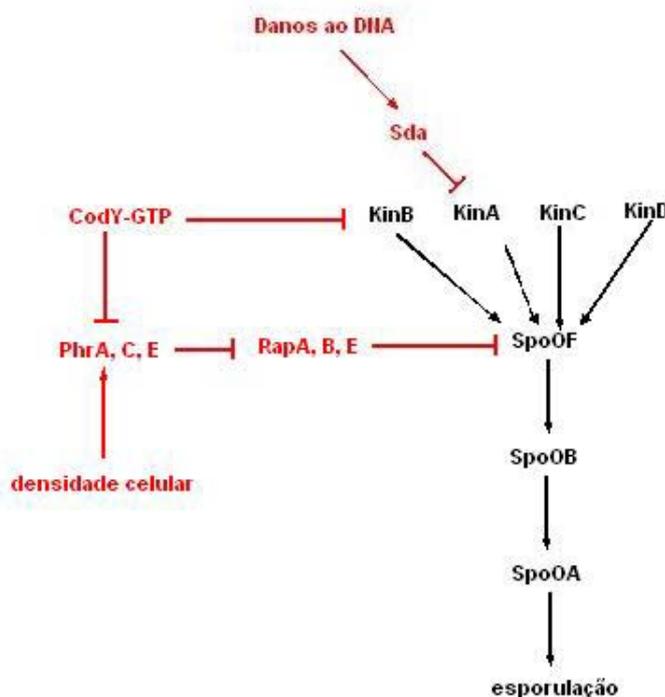


Figura 2.8 – Regulação da esporulação de *B. subtilis*. A presença de GTP e danos ao DNA inibem o processo de esporulação (Modificado de PIGGOT & HILBERT, 2004).

Além dos fatores citados, outros podem afetar a esporulação ou a estabilidade de esporos em *B. subtilis*, como interferências do Ciclo de Krebs (JIN *et al.*, 1997; REAL & HENRIQUES, 2001), condições de anaerobiose, concentrações de determinadas substâncias no meio (SPILIMBERGO *et al.*, 2003), mutações em genes específicos da esporulação (VEPACHEDU & SETLOW, 2004).

2.3.5 Comparação Entre a Regulação da Síntese de Lipopeptídeos e da Esporulação

Como visto anteriormente, o operon *srfA* é um dos *loci* cromossômicos envolvidos na síntese de surfactina. Além da síntese deste lipopeptídeo, a transcrição de seus genes afeta a competência microbiana e esporulação (NAKANO *et al.*, 1988; NAKANO *et al.*, 1991a; NAKANO *et al.*, 1991b; KOSARIC, 1993; REHM & REED, 1997; STROHL, 1997; STACHELHAUS *et al.*, 2002; STEIN, 2005).

Em resposta a uma situação de *stress*, o gene *comX* do operon *srfB* sintetiza o feromônio ComX, que, por sua vez, tem sua exportação facilitada pela proteína ComQ. O

feromônio ComX, no meio, estimula a autofosforilação da proteína comP no seu resíduo de histidina, que desencadeia, juntamente com a proteína aspartil-fosfato fosfatase (RapC), uma cascata de transdução de sinais que regula por mecanismo de fosforilação/defosforilação a ativação de ComA. Esta proteína, fosforilada nos seus três resíduos de aspartato (N-terminal), se organiza em um dímero, reconhece e se liga em uma região específica do promotor do operon *srfA*, atraindo a RNA polimerase, que transcreve os genes para síntese de surfactina, bem como *ComS*, gene que ativa a transcrição do fator de competência *ComK* (NAKANO *et al.*, 1989 e 1991a; ROGGINAI & DUBNAU, 1993; REHM & REED, 1997; KARATAS *et al.*, 2003; STEIN, 2005) (Fig. 2.9).

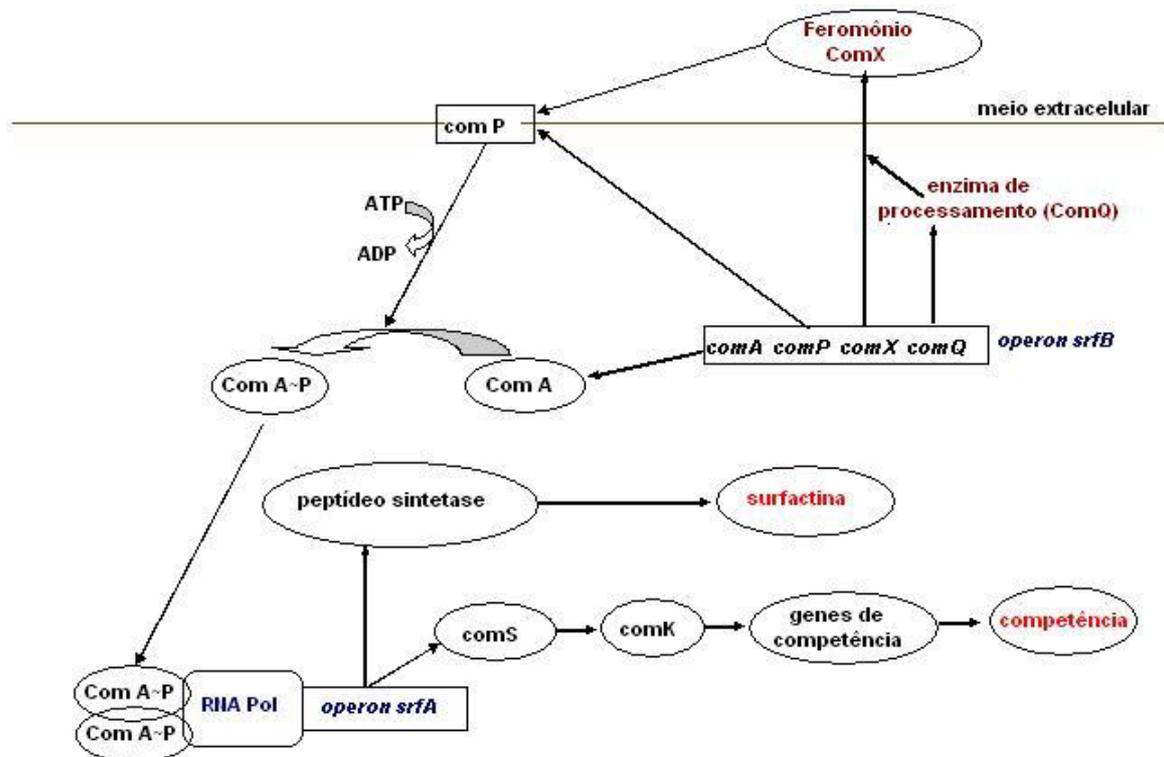


Figura 2.9 – Mecanismo integrado entre a síntese de surfactina e competência microbiana em *B. subtilis* (Modificado de STROHL, 1997).

A transdução de sinais que desencadeia a esporulação consiste na detecção de um sinal externo (estados nutricional e metabólico, densidade celular, danos ao DNA) que estimula histidina quinases (Kin A, B, C, D, E) a desencadearem uma onda de fosforilações em proteínas alvo (SpoOF, SpoOB e SpoOA). A proteína SpoOA~P, na célula mãe, desliga o

gene *abrB*, que inibe os genes relacionados com a esporulação (*spoIIA*, *spoIIE*, *spoIIG*), desta maneira ativando o processo de esporogênese (PEREGO, 1997; REAL & HENRIQUES, 2001; PHILLIPS & STRAUCH, 2002; PIGGOT & HILBERT, 2004) (Fig. 2.10). Com a inibição do gene *abrB*, há liberação do fator CSF, que inibe a expressão do gene *comA* e, conseqüentemente, a transcrição de *srfA*, diminuindo a produção de surfactina e inibindo a competência microbiana (REHM & REED, 1997; KIM *et al.*, 2001; KARATAS *et al.*, 2003).

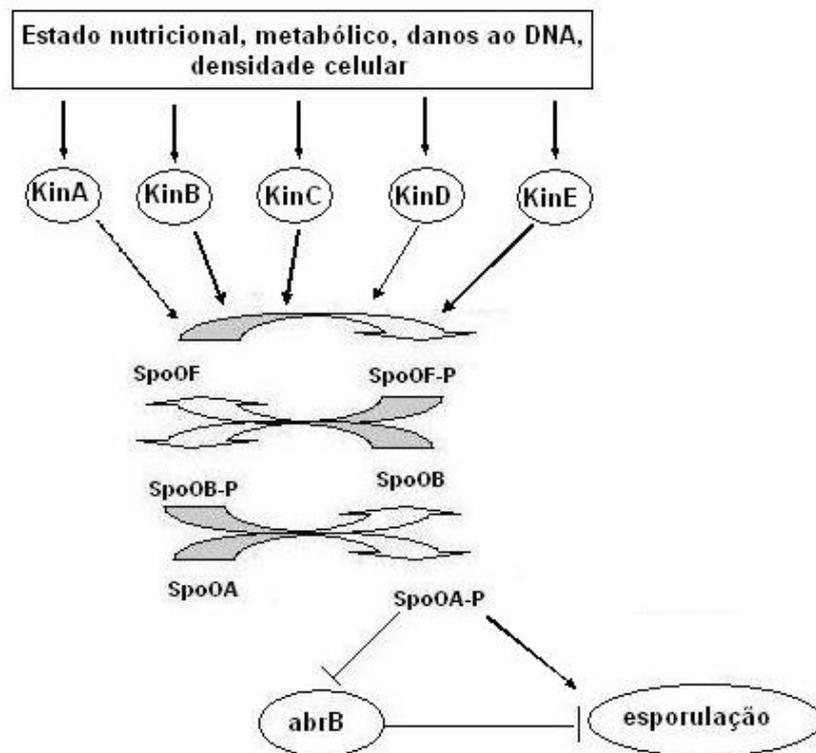


Figura 2.10 - Cascata de transdução de sinais que desencadeia a ativação de genes relacionados com a esporulação de *B. subtilis*. A proteína *abrB*, produto do gene *abrB*, inibe os genes relacionados com a esporulação (Modificado de REAL & HENRIQUES, 2001 e PHILLIPS & STRAUCH, 2002).

Como visto, as vias regulatórias para produção de lipopeptídeos e esporos são diferentes. Portanto, eficientemente, o microrganismo ou esporula ou produz estes compostos durante o crescimento microbiano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

B. subtilis R14 – microrganismo epifítico isolado de folhas de repolho pelo grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Rosa de Lima Ramos Mariano (Laboratório de Fitobacteriologia da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE) – foi utilizado neste trabalho.

Como microrganismo teste para ensaios de atividade antimicrobiana, utilizou-se *A. tumefaciens*, também fornecido pelo Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meios de Conservação

B. subtilis R14 foi mantido a 5°C em tubos inclinados contendo meio Ágar Nutriente (AN) (Tab. 3.1), com subculturas a cada três meses.

Tabela 3.1 – Composição do meio AN utilizado para manutenção de *B. subtilis* R14 (pH 7)

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de carne	1,00
Extrato de levedura	2,00
Peptona de carne	5,00
NaCl	5,00
Agar	15,00

A. tumefaciens foi mantido a 5°C em tubos inclinados contendo meio “Yeast Malt Agar” (YMA) (Tab. 3.2), com subculturas mensais.

Tabela 3.2 – Composição do meio YMA utilizado para manutenção de *A. tumefaciens* (pH 7)

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glucose	10,00
Peptona	5,00
Extrato de levedura	3,00
Extrato de Malte	3,00
Agar	20,00

3.2.2 Meios de Reativação

Para reativação de *B. subtilis* R14 e *A. tumefaciens*, foram utilizados os meios Caldo Nutriente (CN) e “Yeast Malt” (YM), respectivamente, cujas composições são semelhantes às dos meios AN e YMA, exceto pela ausência de ágar no meio de reativação.

3.2.3 Meio Para Produção de Lipopeptídeos

O meio para produção de lipopeptídeos (MPL) foi quimicamente definido, proposto por Carvalho (2005) (Tab. 3.3).

Tabela 3.3 – Composição do meio utilizado para produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* R14 (pH 7)

Componente	Concentração
Glucose	40,00 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,50 g.L ⁻¹
NaNO ₃	8,50 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	13,60 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	4,00 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g.L ⁻¹
Solução de elementos traço	10,00 mL.L ⁻¹

A composição da solução de elementos traço, proposta por Harwood & Cutting (1990), encontra-se descrita na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição da solução de elementos traço (pH 2)

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
CaCl ₂	0,42
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,30
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,10
ZnCl ₂	0,17
CuCl ₂	0,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,06
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,06

3.2.4 Meios Para Avaliar o Crescimento de *Bacillus subtilis* R14 em Anaerobiose

Para avaliar o crescimento de *B. subtilis* R14 em condições de anaerobiose, foram testados nove meios de cultivo, utilizando-se: glucose, glucose/piruvato ou glicerol como fontes de carbono. Como fontes de nitrogênio, foram avaliados meios de cultivos contendo sulfato de amônio e nitrato, separadamente ou em associação (Tab. 3.5).

Tabela 3.5 – Composição dos meios utilizados para se avaliar o crescimento de *B. subtilis* R14 em anaerobiose (pH 7)

Componente	GSN ¹ (g.L ⁻¹)	GS ² (g.L ⁻¹)	GN ³ (g.L ⁻¹)	GPSN ⁴ (g.L ⁻¹)	GPS ⁵ (g.L ⁻¹)	GPN ⁶ (g.L ⁻¹)	GISN ⁷ (g.L ⁻¹)	GIS ⁸ (g.L ⁻¹)	GIN ⁹ (g.L ⁻¹)
Glucose	10,00	10,00	10,00	5,00	5,00	5,00	---	---	---
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00	4,00	---	2,00	4,00	---	2,00	4,00	---
K ₂ HPO ₄	13,60	13,60	13,60	13,60	13,60	13,60	13,60	13,60	13,60
KH ₂ PO ₄	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
NaNO ₃	2,00	---	4,00	2,00	---	4,00	2,00	---	4,00
Piruvato de sódio	---	---	---	5,00	5,00	5,00	---	---	---
Glicerol	---	---	---	---	---	---	10,00	10,00	10,00

¹ Glucose + sulfato de amônio + nitrato de sódio² Glucose + sulfato de amônio³ Glucose + nitrato de sódio⁴ Glucose + piruvato de sódio + sulfato de amônio + nitrato de sódio⁵ Glucose + piruvato de sódio + sulfato de amônio⁶ Glucose + piruvato de sódio + nitrato de sódio⁷ Glicerol + sulfato de amônio + nitrato de sódio⁸ Glicerol + sulfato de amônio⁹ Glicerol + nitrato de sódio

3.3 Procedimento Experimental

3.3.1 Crescimento de *Bacillus subtilis* R14 em Anaerobiose

Subculturas de *B. subtilis* R14 foram feitas em tubos inclinados contendo meio AN e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, meios CN, contidos em frascos Erlenmeyer, foram inoculados com as células de *B. subtilis* R14 com auxílio de uma alça de platina. Então, 10% (v/v) de inóculo foram adicionados a tubos contendo 5 mL de cada um dos meios descritos na Tabela 3.5.

Os tubos foram acondicionados em jarras de GasPak (sistema anaeróbico utilizando o catalisador borohidreto de sódio), com capacidade de 2,5 L, a 37°C. Foram utilizadas duas jarras de Gaspak, cada uma contendo os tubos de ensaio com cada um dos meios analisados.

Inicialmente, foram retiradas as amostras realizando a leituras das absorvâncias no tempo zero. Com 48 e 72 horas, a primeira e a segunda jarra, respectivamente, foram abertas e a absorvância das amostras dos tubos foi lida. Para cada meio testado, um controle em aerobiose foi realizado, no qual os tubos foram acondicionados a 37°C fora das jarras de GasPak. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 Crescimento e Produção de Lipopeptídeos por *Bacillus subtilis* R14

Subculturas de *B. subtilis* R14 foram feitas em tubos inclinados contendo meio AN e incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, meios CN, contidos em frascos Erlenmeyer, preenchidos com 10% de seu volume com o meio, foram inoculados com as células de *B. subtilis* R14. Estes foram acondicionados em mesa rotativa (C25KC New Brunswick Scientific), a 37°C e 250 rpm, até se obter absorvância em torno de 3,00.

Para efetuar os cultivos, os volumes dos frascos Erlenmeyer foram inoculados (10% v/v) em frascos Fernbach de 3 L, contendo diferentes volumes de meio MPL. Para se avaliar a influência da aeração e temperatura na produção de lipopeptídeos durante os cultivos foram feitos experimentos variando os valores dos parâmetros: rotação (150 rpm e 250 rpm), volume de meio de cultivo (250 mL, 500 mL e 1000 mL), e temperatura (30°C e

37°C). Combinando os parâmetros, foram analisadas 12 condições de cultivo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 24 experimentos.

Durante os cultivos, foram acompanhadas as variações das concentrações de biomassa, glucose e nitrito, bem como das atividades antimicrobiana e emulsificante. Após 24 horas da exaustão de glucose, era determinada, também, a concentração de esporos viáveis.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Concentração de Biomassa

A determinação da concentração de biomassa ao longo dos cultivos foi feita por espectrofotometria (Hewlett Packard 8453), com leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 600 nm (CARVALHO, 2005) e pelo método do peso seco (GOODHUE *et al.*, 1986). Para a metodologia do peso seco, membranas Millipore 0,22 µm, livres de umidade, eram previamente pesadas. Posteriormente, 10 mL de cada amostra eram filtrados a vácuo, a membrana era lavada com água destilada, seca em estufa a 80°C por 24 horas, resfriada em dessecador e novamente pesada. A concentração celular, expressa em g.L⁻¹, foi calculada através da equação abaixo:

$$X = \frac{M_f - M_i}{V_a}$$

onde:

X = concentração de células (g.L⁻¹)

M_f = massa da membrana + massa do material celular seco (g)

M_i = massa da membrana (g)

V_a = volume da amostra (mL)

Uma curva de calibração foi realizada entre os valores obtidos por espectrofotometria e concentração celular (Fig. 3.1).

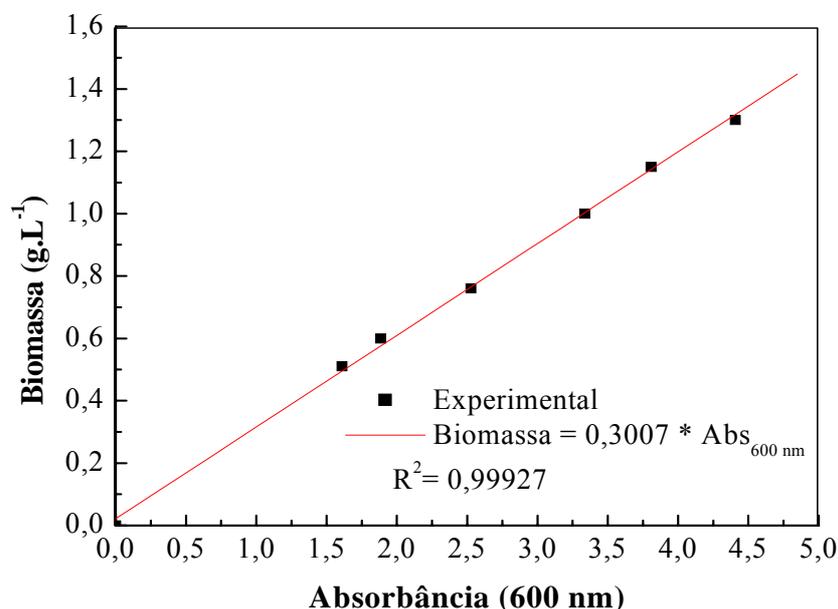


Figura 3.1 – Curva de calibração plotada entre os valores de biomassa e de absorbância em cultivos de *B. subtilis* R14 em meio quimicamente definido.

3.4.2 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido (BAUER & KIRBY, 1966) contra *A. tumefaciens*, devido à sensibilidade deste fitopatógeno aos compostos bioativos produzidos por *B. subtilis* R14 (CARVALHO, 2005). Em placas de Petri (90 mm x 15 mm), foram adicionados 18 mL do meio YMA e 2 mL de uma suspensão de *A. tumefaciens* em solução salina 0,9% (p/v), com concentração celular equivalente ao padrão número 1 na escala de McFarland, que equivale a aproximadamente 10^9 UFC.mL⁻¹. Tendo o meio solidificado, foram colocados, nas superfícies das placas, discos de papel (Watmann n° 5) com 6 mm de diâmetro, previamente autoclavados, embebidos com 20 µL do meio filtrado (pH 7) em membranas Millipore 0,22 µm. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi expressa como o diâmetro do halo de inibição.

3.4.3 Atividade Emulsificante (E_{24})

A atividade emulsificante (E_{24}) foi realizada em tubos de ensaio com tampa rosqueada de 1,0 cm de diâmetro contendo 1 mL da amostra livre de células e 1,5 mL de hexano. Cada tubo foi submetido a vórtex máximo por 2 minutos e deixado em repouso por 24 horas (NITSCHKE & PASTORE, 2003). O índice E_{24} foi determinado através da equação abaixo:

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

onde:

E_{24} = atividade emulsificante (%)

H_e = altura da camada emulsionada (cm)

H_t = altura total do líquido (cm)

3.4.4 Concentração de Glucose

A determinação da concentração de glucose foi feita utilizando-se kit enzimático, de acordo com metodologia enzimático-colorimétrica da Gold Analisa Diagnostica. Neste método, glucose oxidase (GOD) catalisa a oxidação de glucose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento, catalisada por peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância, medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glucose na amostra (SACKS *et al.*, 2002).

3.4.5 Concentração de Nitrito

A determinação da concentração de nitrito foi feita de acordo com a metodologia proposta por Gerhardt *et al.* (1994) e Koneman *et al.* (2001). Neste método, nitrito inorgânico reage com ácido sulfanílico, em pH ácido, formando p-diazoniobenzensulfônico. Através de uma reação de acoplamento, este composto reage com α -naftilamina, em meio ácido,

formando um composto vermelho (ácido p-benzensulfônico-azo-p- α -naftilamina), cuja absorvância, medida em 543 nm, é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra.

3.4.6 Concentração de Esporos Viáveis

A determinação da concentração de esporos viáveis foi realizada por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), na superfície de placas de Petri, divididas em oito setores, contendo meio AN. As amostras foram submetidas a choque térmico em banho-maria (80°C por 12 minutos) para eliminação de células vegetativas. Após diluições sucessivas (10^0 a 10^{-7}) em tubos de ensaio contendo salina esterilizada (NaCl 0,9% p/v), 10 μ L de suspensão de cada diluição foram aplicados nos setores da placa de Petri. As placas foram incubadas a 37°C por 24h (ELÇIN, 1995). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As colônias foram contadas e expressas como UFC.mL⁻¹, representando a média das triplicatas juntamente com o desvio padrão.

3.5 Caracterização Parcial de Compostos Bioativos

3.5.1 Separação e Extração

A separação dos compostos bioativos foi realizada pelo método de precipitação ácida, adaptado de Arima *et al.* (1968), Cooper *et al.* (1981) e Kowall *et al.* (1998). Inicialmente, para a remoção das células, o líquido proveniente do cultivo de *B. subtilis* R14 foi centrifugado a 11000 rpm por 15 minutos. Foi, então, feita adição de HCl 37% (v/v) até que o valor do pH atingisse 2. A amostra acidificada foi mantida em geladeira por 24 horas para facilitar a precipitação e depois centrifugada (11000 rpm, 15 minutos, 4°C).

Para extração dos compostos, o precipitado foi ressuspendido em um volume conhecido de uma solução de clorofórmio-metanol (2:1 v/v) (KIM *et al.*, 1997; QUEIROGA *et al.*, 2003). O frasco contendo a solução foi submetido a uma agitação de 250 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (SYMMANK *et al.*, 2002).

3.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A fim de se verificar a presença de surfactina e outros lipopeptídeos bioativos, foi realizada uma CCD, cuja metodologia foi utilizada por Queiroga *et al.* (2003). Após a extração dos compostos, como descrito em 3.5.1, a solução foi centrifugada (11000 rpm, 15 minutos) e o sobrenadante aplicado, através de capilar, em placa de sílica de 0,25 mm de espessura (Merck, 60 F₂₅₄), utilizando-se dois sistemas eluentes: clorofórmio:metanol:H₂O (65:25:4 v/v/v) (SYMMANK *et al.*, 2002; VATER *et al.*, 2002) e metanol:clorofórmio (60:40 v/v) (CARVALHO, 2005). Os R_fs das manchas reveladas foram comparados ao R_f da surfactina comercial (Sigma) utilizada como padrão.

A revelação química das manchas foi realizada através da aplicação de vapor de iodo às placas e de visualização em luz UV.

Para determinar a presença de compostos com atividade antimicrobiana, procedeu-se uma revelação biológica. Esta consistiu em se espalhar meio YMA inoculado com *A. tumefaciens* sobre a placa onde foi feita a CCD, incubando-a a 30°C por 24 horas. Posteriormente, calculou-se o R_f da mancha do composto com atividade antimicrobiana, detectada através da formação de um halo de inibição ao redor da mancha.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento de *Bacillus subtilis* R14 em Anaerobiose

Como discutido no item 2.3.2, *B. subtilis* era considerado como um microrganismo estritamente aeróbico, entretanto, estudos recentes mostraram que este também cresce em anaerobiose, utilizando nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons ou por fermentação na ausência destes (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER.,1998; RAMOS *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2000) em meios mínimos contendo piruvato ou glicerol como fonte de carbono (NAKANO & ZUBER.,1998).

Para se avaliar a fisiologia de *B. subtilis* R14 em condições de anaerobiose, experimentos foram realizados utilizando-se meios contendo glucose, glucose/piruvato e glicerol, como fontes de carbono, e sulfato de amônio e/ou nitrato de sódio, como fontes de nitrogênio. A Figura 4.1 mostra os resultados dos crescimentos de *B. subtilis* R14 em anaerobiose e aerobiose em diferentes meios de cultivo.

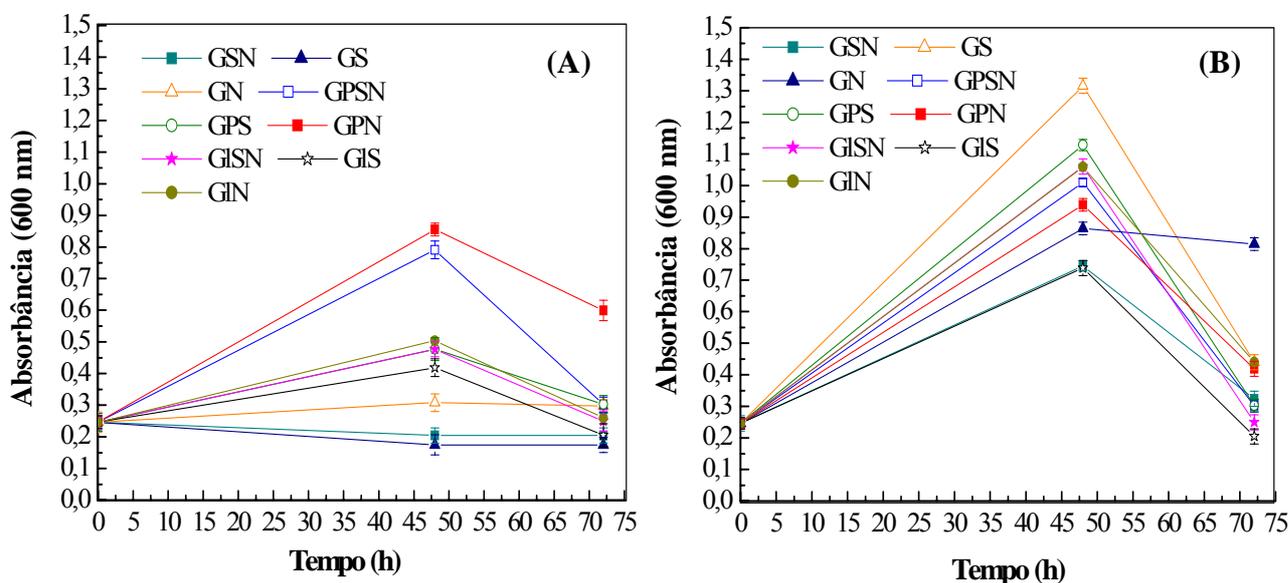


Figura 4.1 – Variação da concentração da biomassa de *B. subtilis* R14 em diferentes meios de cultivo a 37°C: (A) crescimento anaeróbico e (B) crescimento aeróbico. GSN - Glucose + sulfato de amônio + nitrato de sódio; GS - Glucose + sulfato de amônio; GN - Glucose + nitrato de sódio; GPSN - Glucose + piruvato de sódio + sulfato de amônio + nitrato de sódio; GPS - Glucose + piruvato de sódio + sulfato de amônio; GPN - Glucose + piruvato de sódio + nitrato de sódio; GISN - Glicerol + sulfato de amônio + nitrato de sódio; GIS - Glicerol + sulfato de amônio; GIN - Glicerol + nitrato de sódio

Em cultivos anaeróbicos com meios contendo glucose como única fonte de carbono (GSN, GS, GN), não houve crescimento microbiano (Fig. 4.1A). Este comportamento ocorreu, possivelmente, em decorrência da ineficiência da via glucolítica, para produção de biomassa, em condições anaeróbicas (NAKANO & ZUBER, 1998). Observando os cultivos do grupo controle aeróbico nestes mesmos meios, percebe-se que houve crescimento microbiano em todos (Fig. 4.1B). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados com *B. subtilis* R14 por Carvalho (2005).

Em todos os cultivos realizados nos meios contendo glucose e piruvato como fontes de carbono (GPSN, GPS, GPN), foi detectado crescimento microbiano, no entanto, naqueles onde havia nitrato de sódio (GPSN, GPN), foram observados maiores incrementos na biomassa em relação ao crescimento no meio com sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio (GPS) (Fig. 4.1A). Como discutido no item 2.3.2, cultivos anaeróbicos na presença de piruvato como fonte de carbono apresentam crescimentos microbianos tanto por respiração anaeróbica como por fermentação, dependendo da presença ou ausência de nitrato no meio de cultura, respectivamente (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; RAMOS *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2000). O crescimento microbiano em anaerobiose na presença de piruvato ocorre porque a presença deste substrato desreprime o gene que codifica a enzima piruvato desidrogenase (PDH), que catalisa a síntese de acetil-CoA a partir do piruvato (NAKANO *et al.*, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; NAKANO & ZUBER, 2002). Na presença de nitrato, o acetil-CoA sintetizado entra no ciclo de Krebs, equivalentes redutores são gerados, havendo, posteriormente, redução de nitrato a nitrito, correspondendo a uma respiração anaeróbica, que confere um rendimento energético de 36 a 38 ATP (TOTORA *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2000; SONENSHEIN, 2002). Na ausência de nitrato, inicia-se o crescimento pela via fermentativa, na qual energia é gerada por fosforilação em nível de substrato (rendimento energético de 2 ATP); o piruvato é reoxidado, há geração de NADH, que permite que a glucólise continue (NAKANO *et al.*, 1998; TORTORA *et al.*, 2000).

Comparando-se os resultados dos cultivos nos meios GPSN e GPN em anaerobiose (Fig. 4.1A) e aerobiose (Fig. 4.1B), pode-se observar que os rendimentos em biomassa foram semelhantes. Como a respiração aeróbica também tem rendimento energético de 36 a 38 ATP, sugere-se que houve crescimento baseado na respiração anaeróbica, utilizando nitrato como acceptor final de elétrons. Entretanto, para cultivos no meio GPS, o rendimento em biomassa

do cultivo em anaerobiose foi aproximadamente 52% menor em relação ao controle aeróbico, sugerindo um crescimento baseado na fermentação.

Nos meios com glicerol como única fonte de carbono, houve crescimento microbiano em todos os cultivos, entretanto, foram detectados maiores incrementos na biomassa nos meios contendo nitrato de sódio (GISN e GIN) em relação ao meio contendo apenas sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (GIS) (Fig. 4.1A). Comparando-se o crescimento microbiano nestes meios em anaerobiose (Fig. 4.1A) e aerobiose (Fig. 4.1B), observa-se que os rendimentos em biomassa na primeira situação sempre foram menores do que na condição aeróbica, o que sugeriria um crescimento baseado na fermentação. Entretanto, como visto anteriormente, glicerol é uma fonte de carbono não fermentescível, portanto, a única via de crescimento utilizando este substrato é a partir da respiração anaeróbica, quando nitrato está presente no meio (NAKANO & ZUBER, 1998; CLEMENTS *et al.*, 2002), embora um pequeno crescimento tenha sido observado no meio sem nitrato.

4.2 Crescimento sob Diferentes Condições de Temperatura e Aeração

Em geral, os microrganismos respondem de maneiras distintas às diferentes condições ambientais às quais são submetidos (TORTORA *et al.*, 2000). Cultivos com *B. subtilis* R14 foram realizados utilizando diferentes condições de aeração e temperatura. Para se avaliar a influência destes parâmetros na fisiologia do microrganismo, foram acompanhados o crescimento microbiano, o consumo de substratos e o comportamento do pH durante os cultivos.

A Tabela 4.1 mostra os valores dos tempos decorridos desde o início dos cultivos até a fase de declínio celular nas diferentes condições de aeração (i.e. agitação e volume de meio) e temperatura estudadas.

Tabela 4.1 – Valores dos tempos decorridos desde o início dos cultivos até a fase de declínio celular em todas as condições experimentais nos cultivos de *B. subtilis* R14.

Condições experimentais	Tempo de cultivo até o início da fase de declínio (h)
30°C; 150 rpm; 250 mL	35,5
30°C; 150 rpm; 500 mL	27,5
30°C; 150 rpm; 1000 mL	35,5
30°C; 250 rpm; 250 mL	23,0
30°C; 250 rpm; 500 mL	23,0
30°C; 250 rpm; 1000 mL	25,0
37°C; 150 rpm; 250 mL	17,5
37°C; 150 rpm; 500 mL	15,5
37°C; 150 rpm; 1000 mL	15,5
37°C; 250 rpm; 250 mL	12,0
37°C; 250 rpm; 500 mL	12,0
37°C; 250 rpm; 1000 mL	12,0

4.2.1 Temperatura

Observando-se a Tabela 4.1, conclui-se que em cultivos realizados a 37°C, os tempos de cultivo sempre foram menores do que naqueles mantidos a 30°C. Em estudos realizados por Carvalho (2005) com *B. subtilis* R14, é relatado que valores de velocidade máxima de crescimento microbiano a 37°C é aproximadamente duas vezes maior do que a 30°C.

4.2.2 Aeração

Fixando os valores de temperatura e volume de meio de cultura, pode-se visualizar que os valores dos tempos decorridos desde o início dos cultivos até a fase de declínio celular sempre foram menores na rotação de 250 rpm (Tab. 4.1). Este comportamento é esperado, visto que nestas condições a aeração é maior, favorecendo o crescimento microbiano.

4.2.3 Consumo de Substratos

Com relação à fonte de carbono, pode-se observar que há decréscimo na concentração de glucose concomitante com o crescimento microbiano (Fig. 4.2 e 4.3), e que, quando esta concentração atinge valor próximo de zero, o crescimento pára. A exceção foi observada na condição de 30°C, 150 rpm e 1000 mL (Figura 4.2C), na qual houve parada do crescimento microbiano ainda restando 5,65 g.L⁻¹ de glucose. Para esta situação, é possível que tenha ocorrido uma restrição excessiva de oxigênio, em decorrência da baixa rotação associada ao elevado volume de meio, não suportada pelo microrganismo em temperatura não ótima para o seu crescimento.

Com relação ao nitrato, pode-se observar que em todos os experimentos houve redução de nitrato a nitrito desde o início dos cultivos (Fig. 4.2 e 4.3). Como as concentrações de sulfato de amônio eram suficientes para o crescimento, possivelmente, o microrganismo tenha utilizado aquele íon como acceptor final de elétrons, levando-se a crer que tenha havido crescimento com restrição de oxigênio em todos os cultivos, embora em graus distintos.

4.2.4 Comportamento do pH

Observando-se os perfis de pH em todos os cultivos (Fig. 4.2 e 4.3), pode-se visualizar um decréscimo dos valores acompanhando o crescimento microbiano. Uma mudança nesta tendência é notada quando são atingidos valores elevados de biomassa e reduzidos de glucose. Resultados semelhantes foram obtidos por estudos realizados com *B. subtilis* R14 por Luna *et al.* (2002), nos quais os valores de pH diminuía durante o crescimento celular e, posteriormente, aumentavam quando o microrganismo iniciava o processo de esporulação em decorrência da exaustão da glucose. Uma explicação para este comportamento seria a produção de acetato durante o crescimento celular (Fig. 2.2), promovendo decréscimo no pH com posterior conversão deste produto para acetoína catalisada pela enzima acetolactato descarboxilase, ativada ob condições de restrição de oxigênio (YE *et al.*, 2000), promovendo aumento nestes valores. Uma outra explicação para este aumento poderia ser o excesso de íons NH₄⁺, provenientes da redução de íons nitrito pela enzima nitrito redutase (NAKANO & HULETT, 1997).

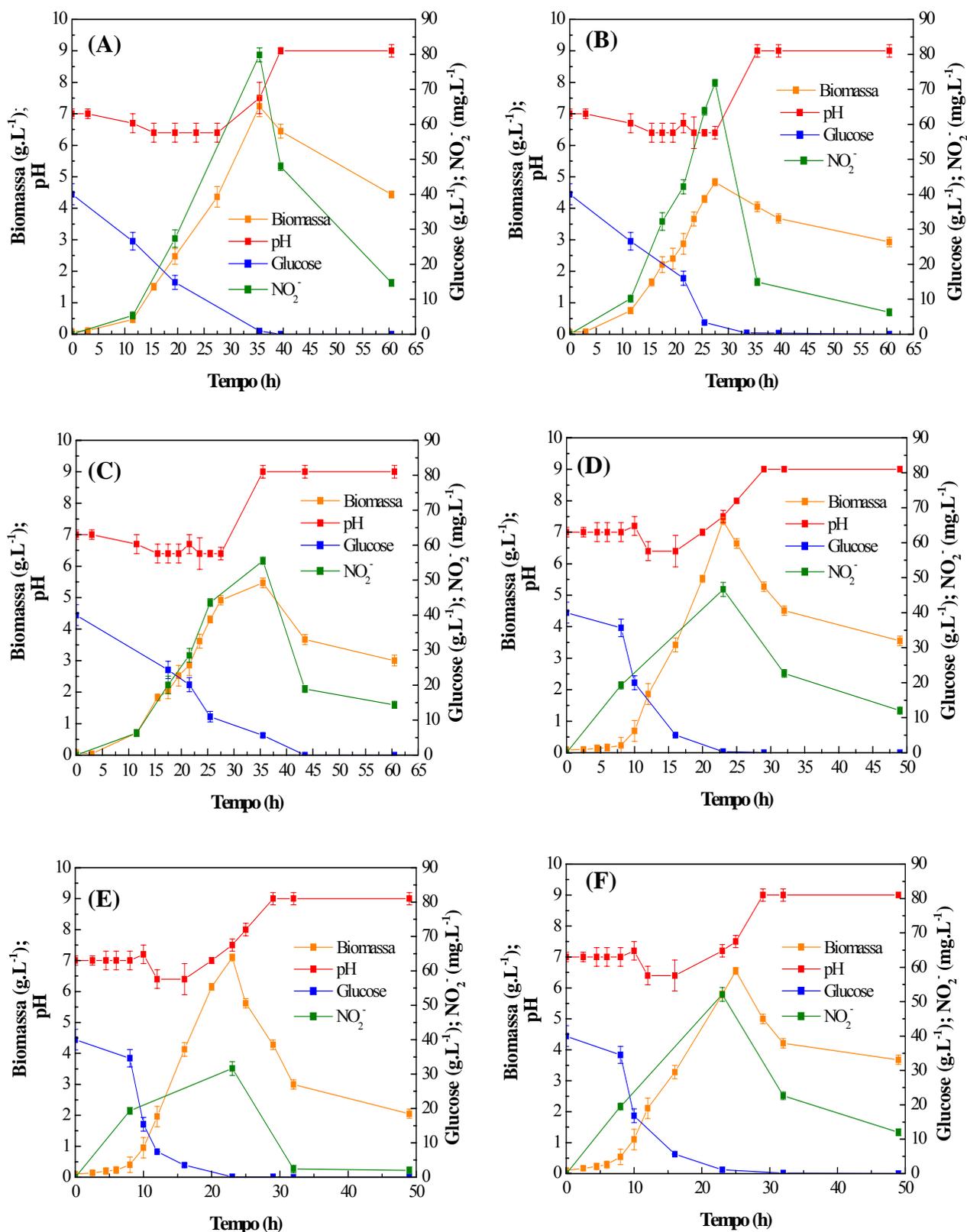


Figura 4.2 – Comportamento do crescimento microbiano, pH e consumo de substratos nos cultivos de *B. subtilis* R14 realizados a 30°C: (A) 150 rpm, 250 mL; (B) 150 rpm, 500 mL; (C) 150 rpm, 1000 mL; (D) 250 rpm, 250 mL; (E) 250 rpm, 500 mL; (F) 250 rpm, 1000 mL.

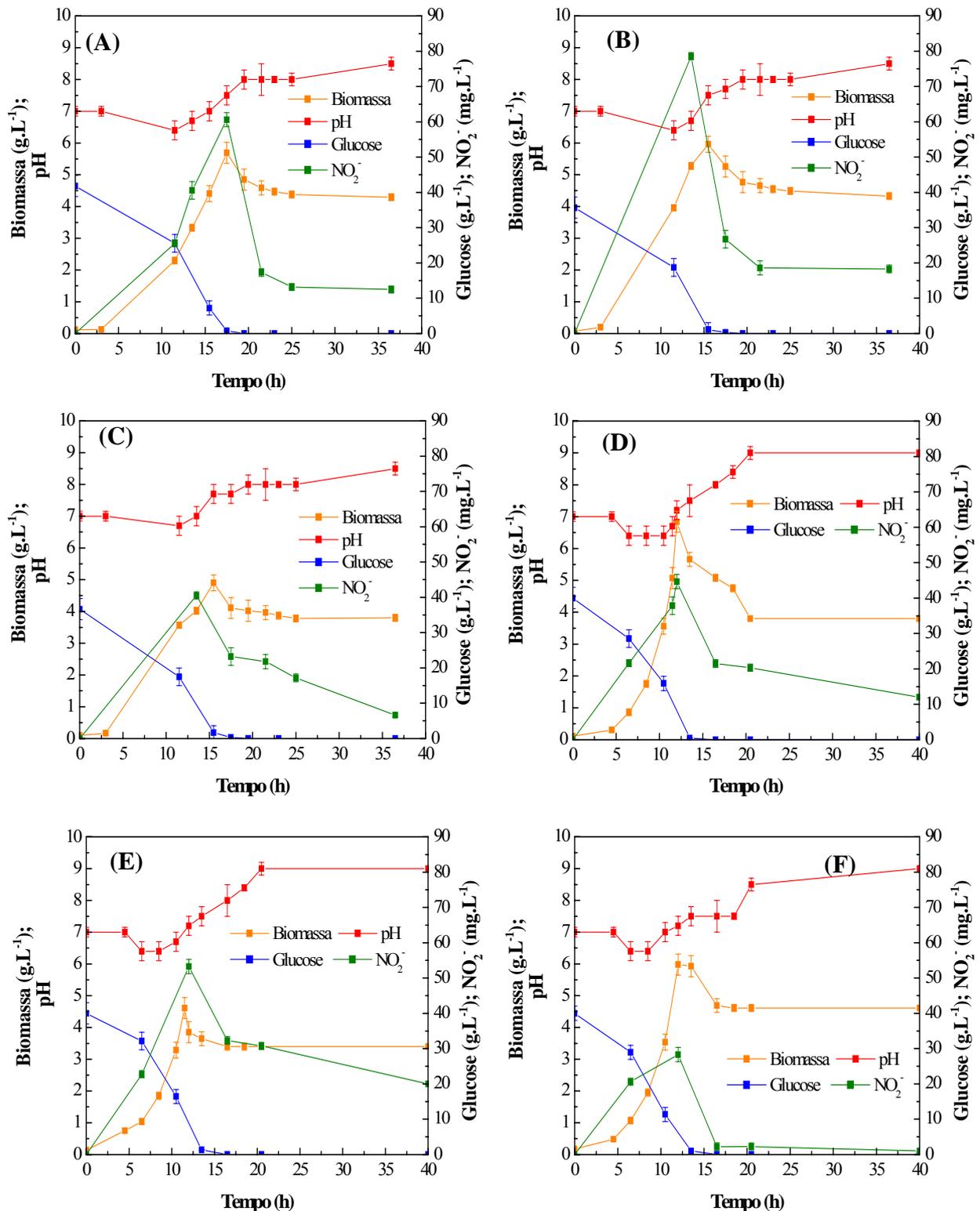


Figura 4.3 – Comportamento do crescimento microbiano, pH e consumo de substratos nos cultivos de *B. subtilis* R14 realizados a 37°C: (A) 150 rpm, 250 mL; (B) 150 rpm, 500 mL; (C) 150 rpm, 1000 mL; (D) 250 rpm, 250 mL; (E) 250 rpm, 500 mL; (F) 250 rpm, 1000 mL.

4.3 Produção de Compostos Bioativos sob Diferentes Condições de Temperatura e Aeração

Neste item, são apresentados os resultados da influência das diferentes condições de aeração e temperatura na produção de compostos bioativos por *B. subtilis* R14. As Figuras 4.4 e 4.5 mostram a relação entre a produção de compostos bioativos e o crescimento microbiano em todas as condições estudadas.

4.3.1 Produção *versus* Crescimento Microbiano

Nas Figuras 4.4 e 4.5, observa-se que a produção de compostos bioativos sempre ocorreu durante a fase de crescimento. Resultado semelhante também foi obtido por Carvalho (2005). Quando a fase de declínio celular foi atingida, momento em que houve exaustão da glucose, diminuição destes valores foi detectada em todas as situações.

Em alguns trabalhos visando a produção de compostos com atividade antimicrobiana por *B. subtilis* CL27 e *B. pumilus* CL45 (LEIFERT *et al.*, 1995), bem como com atividade surfactante por *B. licheniformis* JF-2 (LIN *et al.*, 1993), é relatado haver produção dos mesmos durante a fase de crescimento e depleção quando o microrganismo entra na fase estacionária. Estudos realizados por Lin *et al.* (1993) mostram que há internalização de alguns antibióticos, como a polimixina, bem como de biosurfactantes, em cultivos de *B. licheniformis* JF-2 e que este fenômeno é independente de energia proveniente de ATP. Estudos realizados por estes autores ainda mostram que, apesar da internalização destes compostos ocorrer quando há exaustão da glucose, os mesmos não são utilizados como fonte de carbono pela célula, visto que aumento na concentração deste substrato não modifica o perfil de desaparecimento de biosurfactantes em cultivos de *B. licheniformis* JF-2.

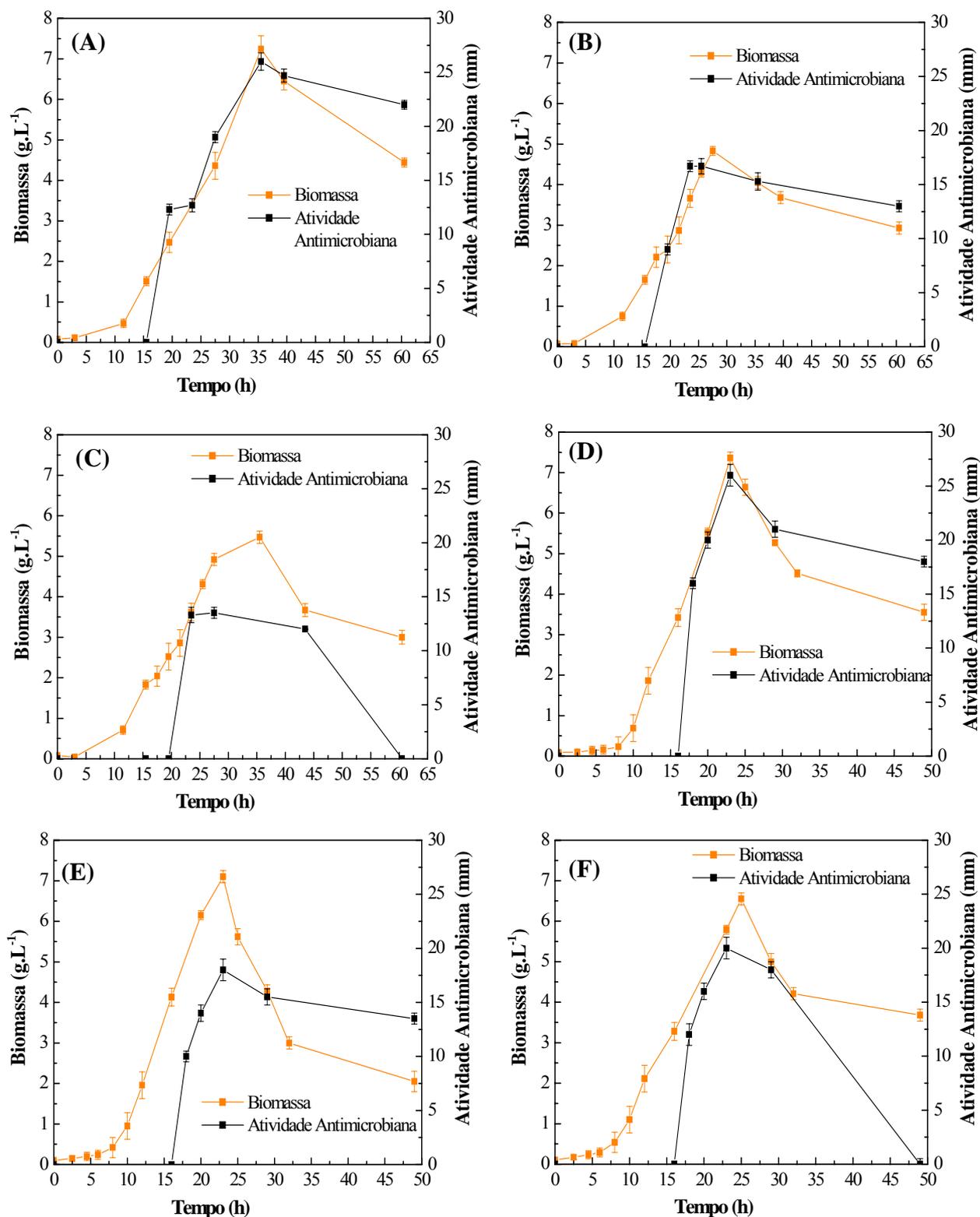


Figura 4.4 – Crescimento microbiano e produção de compostos bioativos durante cultivos de *B. subtilis* R14 realizados a 30°C: (A) 150 rpm; 250 mL; (B) 150 rpm; 500 mL; (C) 150 rpm; 1000 mL; (D) 250 rpm; 250 mL; (E) 250 rpm; 500 mL (F) 250 rpm; 1000 mL.

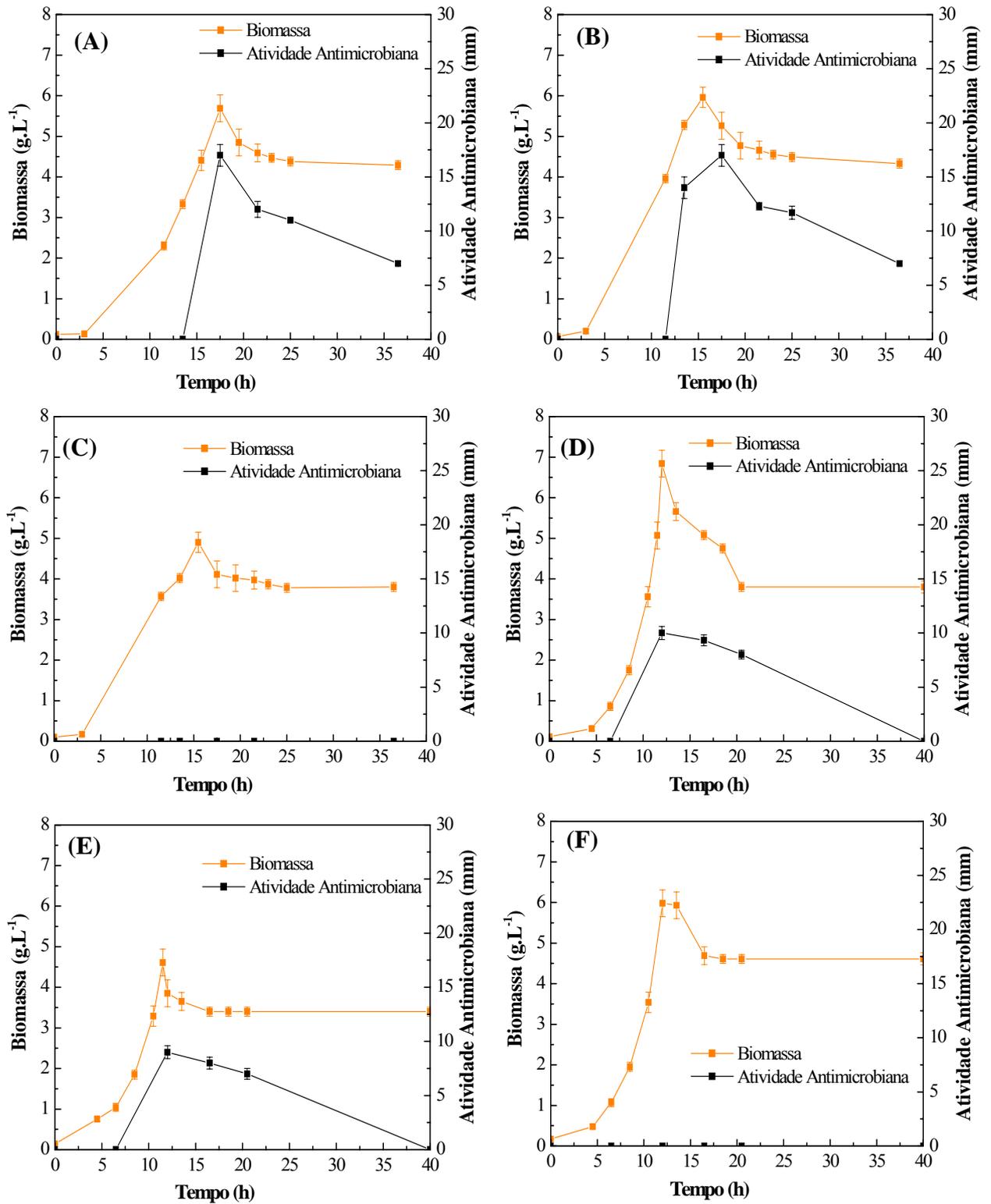


Figura 4.5 – Crescimento microbiano e produção de compostos bioativos durante cultivos de *B. subtilis* R14 realizados a 37°C: (A) 150 rpm; 250 mL; (B) 150 rpm; 500 mL; (C) 150 rpm; 1000 mL; (D) 250 rpm; 250 mL; (E) 250 rpm; 500 mL (F) 250 rpm; 1000 mL.

4.3.2 Temperatura

Em relação ao efeito da temperatura, analisando-se novamente as Figuras 4.4 e 4.5, observa-se que, nos cultivos realizados a 30°C (Fig. 4.4), a produção de compostos bioativos sempre foi maior do que naqueles incubados a 37°C (Fig. 4.5). Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que relatasse a influência da temperatura na produção de compostos bioativos por outras linhagens de *B. subtilis*, embora, em muitos trabalhos, a temperatura de 30°C seja utilizada na produção destes compostos. (KIM *et al.*, 1997; DAVIS *et al.*, 1999; BAIS *et al.*, 2004)

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que na temperatura de 37°C, que é a ótima para o crescimento microbiano (Tab. 4.1), também há produção de compostos com atividade antimicrobiana, refletida na detecção de halo de inibição, cujo valor máximo atingiu 17 mm; enquanto à 30°C, o valor máximo detectado foi de 26 mm. Portanto, à 30°C, a produção é maior. No entanto, para que seja atingida a máxima concentração de compostos antibióticos a 30°C, são transcorridas 35,5 h (150 rpm) e 23,0 h (250 rpm). À temperatura de 37°C, concentrações máximas são atingidas com 17,5 h de cultivo (150 rpm) e 12,00 h (250 rpm). Portanto, a produtividade, que é a relação entre a produção e o tempo de cultivo, é maior a 37°C.

4.3.3 Aeração

Comparando-se, para uma mesma temperatura e volume de meio de cultura, a produção de compostos bioativos nas duas rotações utilizadas (150 rpm e 250 rpm), observa-se que estes foram maiores na rotação de 250 rpm a 30°C (Fig. 4.4 D, E, F). No entanto, para a temperatura de 37°C, maior produção foi detectada na rotação de 150 rpm (Fig. 4.5 A, B, C).

Comparando-se, para uma mesma temperatura e rotação, a produção de compostos bioativos nos três volumes de meio de cultivo utilizados (250 mL, 500 mL e 1000 mL), verifica-se que estes são sempre maiores no volume de 250 mL (Fig. 4.4 A, D e 4.5 A, D). No volume de 1000 mL, não houve produção de compostos bioativos na temperatura de 37°C (Fig. 4.5 C, F).

Trabalhos indicam que compostos bioativos são produzidos com rendimento maior quando *B. subtilis* C9 (KIM *et al.*, 1997), *B. subtilis* ATCC 21332 (DAVIS *et al.*, 1999), *B. subtilis* 355 (MOITA *et al.*, 2005) e *B. subtilis* R14 (CARVALHO, 2005) são cultivados sob restrição de oxigênio. Como discutido anteriormente, todos os experimentos estão sob restrição de oxigênio. No entanto, pelos resultados, observa-se que fortes restrições de oxigênio, causadas pelo aumento do volume do meio de cultivo ou diminuição na rotação, podem não ter efeito positivo na produção.

4.4 Produção de Compostos Surfactantes sob Diferentes Condições de Temperatura e Aeração

Como visto no item 2.2, *B. subtilis* produz compostos, principalmente lipopeptídeos, com atividade antimicrobiana e surfactante. Portanto, nas amostras testadas no item 4.3, testes de atividade emulsificante também foram realizados. Na Tabela 4.2, são apresentados os resultados da influência das diferentes condições de aeração e temperatura na produção de compostos surfactantes por *B. subtilis* R14.

Tabela 4.2 – Valores máximos de atividades emulsificantes (E_{24}) atingidos durante a fase de crescimento de *B. subtilis* R14 para cada uma das situações analisadas

Situação	E_{24} (%)
30°C; 150 rpm; 250 mL	78,20
30°C; 150 rpm; 500 mL	73,90
30°C; 150 rpm; 1000 mL	77,20
30°C; 250 rpm; 250 mL	60,00
30°C; 250 rpm; 500 mL	60,00
30°C; 250 rpm; 1000 mL	52,00
37°C; 150 rpm; 250 mL	57,14
37°C; 150 rpm; 500 mL	55,56
37°C; 150 rpm; 1000 mL	58,62
37°C; 250 rpm; 250 mL	40,00
37°C; 250 rpm; 500 mL	46,33
37°C; 250 rpm; 1000 mL	50,00

4.4.1 Temperatura

Observando-se a Tabela 4.2, pode-se perceber que a temperatura onde se detectou maior produção de compostos surfactantes foi a 30°C. Resultado semelhante foi obtido por Vater *et al.* (2002) estudando a linhagem *B. subtilis* C-1.

Comparando-se as condições onde houve maiores produções de compostos bioativos e surfactantes, conclui-se que estas não foram as mesmas, pois apesar da temperatura ser igual, a rotação foi diferente. Portanto, sugere-se que pelo menos dois compostos bioativos foram produzidos: um com atividade predominantemente antimicrobiana e outro com atividade principalmente emulsificante.

4.4.2 Aeração

Fixando-se os valores de temperatura e volume de meio de cultura, observaram-se maiores atividades emulsificantes nas amostras de cultivos realizados na rotação de 150 rpm para ambas as temperaturas. Portanto, a restrição de oxigênio foi um parâmetro que também influenciou a produção de compostos surfactantes. Trabalhos realizados por Kim *et al.* (1997) relatam que a produção do biosurfactante surfactina é aumentada sob condições de restrição de oxigênio.

4.5 Produção de Esporos sob Diferentes Condições de Aeração e Temperatura

Como visto no item 2.3.5, as vias regulatórias da produção de compostos bioativos e de esporos são diferentes, sugerindo que ou o microrganismo esporula ou produz tais compostos eficientemente. Entretanto, para o controle biológico, seria interessante uma situação em que ambos os produtos fossem formados eficientemente. Em todas as condições analisadas, foram feitas as análises das concentrações de esporos viáveis, cujos resultados estão apresentados na Figura 4.6.

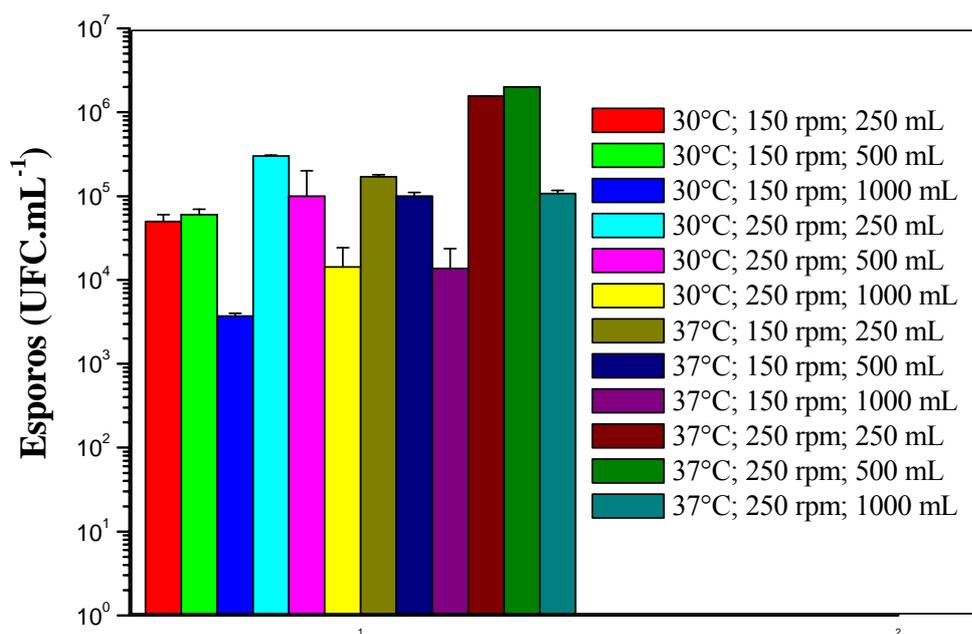


Figura 4.6 – Produção máxima de esporos por *B. subtilis* R14 durante cultivos em diferentes condições de temperatura e aeração.

Em todas as situações analisadas, houve produção de esporos, embora com concentrações menores se comparadas com as ordens de grandeza atingidas em cultivos bem aerados (10^8 a 10^9 UFC.mL⁻¹), destinados essencialmente para produção de esporos (LUNA *et al.*, 2002; CARVALHO, 2005).

As maiores concentrações finais de esporos foram atingidas na condição de 37°C e 250 rpm. Menores valores foram obtidos na condição de 30°C e 150 rpm. Estes resultados eram esperados, visto que estudos realizados com *B. subtilis* R14 por Carvalho (2005), em meios sem restrição de oxigênio, demonstraram que, assim como para o crescimento vegetativo, a temperatura de 37°C é melhor para produção de esporos se comparado com a de 30°C. Com relação à rotação, era esperado que a 250 rpm, a produção de esporos fosse maior, pois é aquela que confere maior aeração. Como visto anteriormente, cultivos bem aerados possuem um rendimento de biomassa elevado. O contrário ocorre com a rotação de 150 rpm. Nesta situação, a restrição de oxigênio é maior e, portanto, menores concentrações de esporos são esperadas.

Finalmente, a condição de 30°C e 250 rpm e a condição de 37°C e 150 rpm foram equivalentes. Para todas as situações, no volume de 1000 mL, foram obtidas as menores

concentrações de esporos, possivelmente em decorrência da restrição de oxigênio nessa situação ser muito grande, dificultando o processo de esporulação.

Na situação onde foi detectada a maior produção de esporos (37°C, 250 rpm), também foi detectada a menor produção de compostos bioativos (Fig. 4.5 D, E, F). Por outro lado, na situação onde se detectou a menor produção de esporos (30°C, 150 rpm), a produção de compostos bioativos foi maior (Fig. 4.4 A, B, C).

Uma outra diferença entre a produção de compostos bioativos e esporos é a fase do ciclo em que elas ocorrem. A produção daqueles ocorre durante a fase de crescimento celular, ao passo que a produção destes ocorre quando há exaustão de glucose, ou seja, quando o crescimento celular entra na fase de declínio. Como discutido anteriormente, nesta fase, começa um fenômeno de desaparecimento dos compostos bioativos antibióticos. Portanto, quando se inicia a produção de esporos, também é iniciada depleção dos compostos bioativos com atividade antimicrobiana, sugerindo que em um processo descontínuo ou há produção de compostos bioativos ou esporulação eficiente por *B. subtilis* R14. Como visto no item 2.3.5, é afirmado que as vias metabólicas de produção de lipopeptídeos e esporos são diferentes, portanto, ou há esporulação ou produção de compostos bioativos eficientemente (STROHL, 1997).

4.6 Extração e Caracterização Parcial de Compostos Bioativos Produzidos por *B. subtilis* R14

Como sugerido anteriormente, pelo menos dois compostos bioativos foram produzidos por *B. subtilis* R14: um com atividade essencialmente antimicrobiana e outro com atividade predominantemente biossurfactante. Para detectar se isto realmente ocorreu, ensaios em CCD foram realizados.

Primeiramente, foi realizada a separação e extração dos compostos bioativos produzidos por *B. subtilis* R14, sendo utilizada a amostra de 35,5 horas do cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e 250 mL, devido à grande produção obtida nesta condição. Após a separação dos componentes presentes no meio, testes de atividade emulsificante (Fig. 4.7) e antimicrobiana (Fig. 4.8) foram realizados para detectar a presença de compostos bioativos no sobrenadante e no precipitado.

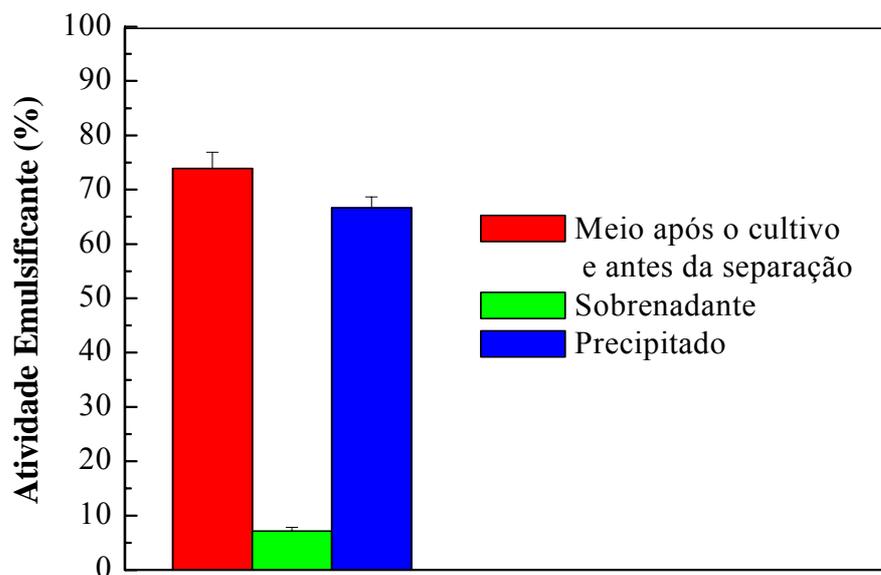


Figura 4.7 – Atividade emulsificante do meio após cultivo de *B. subtilis* R14, antes do procedimento de separação dos seus componentes, do sobrenadante e do precipitado.

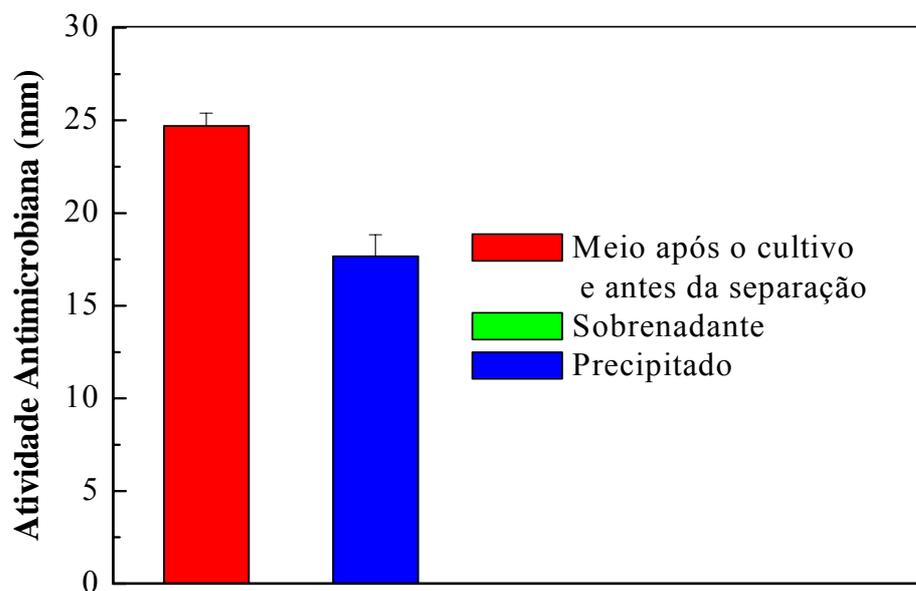


Figura 4.8 – Atividade antimicrobiana do meio após o cultivo de *B. subtilis* R14, antes do procedimento de extração de compostos bioativos, do sobrenadante e do precipitado.

Nas Figuras 4.7 e 4.8, verifica-se que tanto os compostos bioativos como os surfactantes estão presentes predominantemente no precipitado.

Como a presença de compostos bioativos e surfactante foi predominante no precipitado, a extração dos compostos bioativos ocorreu nesta fração. Para isto, utilizou-se a solução extratora clorofórmio:metanol (2:1 v/v). Foi observada uma mistura heterogênea bifásica, composta de uma fase metanólica (polar) e uma clorofórmica (apolar). Para detectar em qual destas fases os compostos bioativos estavam presentes, ensaios em CCD foram realizados. Dois sistemas eluentes foram testados na CCD: um com caráter mais apolar, composto por clorofórmio:metanol:H₂O (65:25:4 v/v/v) (SYMMANK *et al.*, 2002; VATER *et al.*, 2002) e outro com caráter mais polar, composto por metanol:clorofórmio (60:40 v/v) (CARVALHO, 2005).

Tanto amostras da fase metanólica como da clorofórmica foram aplicadas nos ensaios de CCD. No sistema eluente mais apolar, não houve deslocamento das amostras pela placa de sílica. Com o sistema eluente mais polar, conseguiu-se deslocamento da amostra e separação de dois compostos apenas na fase metanólica (Fig. 4.9).

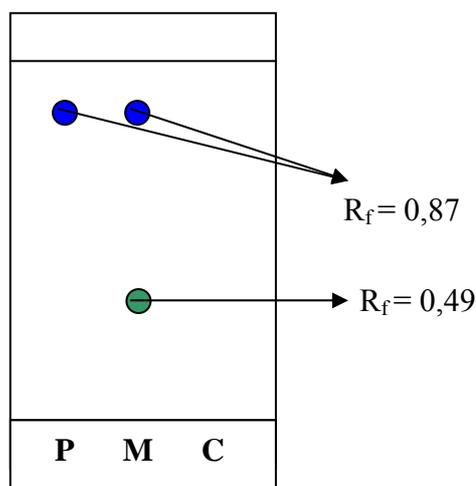


Figura 4.9 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) realizada em placa de sílica de 0,25 mm de espessura (Merck, 60 F₂₅₄). P = padrão (surfactina comercial da Sigma); M = fase metanólica; C = fase clorofórmica.

Foram observados duas manchas na fase metanólica: uma com $R_f = 0,49$ e outra com $R_f = 0,87$. Estudos realizados por Razafindralambo *et al.* (1993) indicam que lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* são identificados na porção metanólica, quando a solução clorofórmio:metanol é utilizada como extratora. O valor do R_f da surfactina comercial (Sigma) utilizada como padrão foi de 0,87, sugerindo que a mancha com mesmo valor de R_f presente na amostra é a surfactina.

Um ensaio biológico foi também realizado para se identificar atividade antimicrobiana nos compostos separados na CCD. Um halo de inibição foi observado ao redor da mancha com $R_f = 0,49$, mas não na mancha de $R_f = 0,87$, nem na da surfactina comercial. Para confirmar se a surfactina pura não possuía atividade antimicrobiana, testes de difusão em meio sólido foram realizados com este lipopeptídeo. O resultado foi ausência de halo ao redor do disco que continha este comoposto.

A partir destes resultados, verifica-se que houve produção de pelo menos dois compostos bioativos: a surfactina ($R_f = 0,87$), que é o biossurfactante reconhecidamente mais potente (LANG, 2002) e outro com atividade essencialmente antimicrobiana ($R_f = 0,49$). Como visto no item 2.2.1, é relatado, para algumas linhagens de *B. subtilis*, que a surfactina sozinha não possui atividade antimicrobiana, mas aumenta significativamente a atividade da iturina, através de uma relação sinérgica (HIRAOKA *et al.*, 1992; MAGET-DANA *et al.*, 1992; THIMON *et al.*, 1992; RAZAFINDRALAMBO *et al.*, 1993; ASAKA *et al.*, 1996b), ou seja, a surfactina enfraquece (solubiliza) a membrana celular devido à sua propriedade biossurfactante, facilitando o ataque da iturina, que possui propriedade antimicrobiana (MAGET-DANA *et al.*, 1992; PHAE *et al.*, 1992). Como *B. subtilis* R14 produz surfactina e como, em geral, há produção concomitante de surfactina e iturinas em outras linhagens, provavelmente o composto bioativo que possui $R_f = 0,49$ seja uma iturina.

5. CONCLUSÕES

- Dos experimentos realizados para se avaliar o crescimento de *B. subtilis* R14 em anaerobiose, foi reafirmado que a linhagem não é estritamente anaeróbia. Em cultivos realizados em meios mínimos contendo glucose, como fonte de carbono, e sulfato de amônio e/ou nitrato de sódio, como fontes de nitrogênio, não há crescimento microbiano. No entanto, há crescimento quando piruvato é adicionado aos meios. O crescimento também é observado quando glicerol é utilizado como fonte de carbono. Respiração aneróbica ou fermentação ocorre dependendo da presença ou não de nitrato de sódio no meio, respectivamente.
- Com relação ao efeito da temperatura no crescimento, produção de compostos bioativos e esporulação de *B. subtilis* R14 sob restrição de oxigênio, os resultados permitiram se concluir que 37°C é a temperatura que favore o crescimento microbiano e a esporulação, ao passo que 30°C favorece a produção de compostos bioativo e surfactante. À 30°C, apesar do crescimento microbiano ser mais lento, o rendimento de compostos bioativos é maior. Na temperatura de 37°C, o microrganismo cresce mais rápido, havendo também produção de compostos bioativos, e, neste caso, a produtividade é maior.
- Com relação ao efeito da aeração no crescimento, produção de compostos bioativos e esporulação de *B. subtilis* R14, os resultados levaram à conclusão de que condições de restrição de oxigênio são favoráveis à produção de compostos bioativos e surfactantes. No entanto, o aumento excessivo da restrição é desfavorável à produção destes compostos. Cultivos mais aerados são propícios para o crescimento microbiano e produção de esporos. Portanto, condições favoráveis para esporulação são desfavoráveis para produção de compostos bioativos e surfactantes e vice-versa.

- Com relação ao perfil de produção de compostos bioativos por *B. subtilis* R14 sob restrição de oxigênio, observou-se que a produção ocorre apenas durante a fase de crescimento, havendo depleção de tais compostos quando o crescimento microbiano atinge a fase de declínio.
- Com relação à caracterização dos compostos bioativos produzidos por *B. subtilis* R14 durante a fase de crescimento sob restrição de oxigênio, conclui-se que ocorre produção de pelo menos dois compostos ativos: a surfactina, com atividade predominantemente surfactante e um composto com atividade antimicrobiana.

6. PERSPECTIVAS

Com a perspectiva de continuar o estudo da fisiologia microbiana e aplicação industrial dos compostos produzidos por *B. subtilis* R14, sugere-se para trabalhos futuros:

- A caracterização química do composto produzido com atividade antimicrobiana.
- A avaliação da influência das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio na produção dos compostos bioativos.
- A produção de compostos bioativos em meio industrial.
- A avaliação da estabilidade de esporos e dos compostos bioativos em diferentes condições de temperatura e pH.
- A aplicação dos compostos bioativos e esporos no controle biológico *in vivo* de fitopatógenos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and Iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, 27, 749–754, 2000.
- AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91–93, 551-561, 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ARBIGE, M.V.; BULTHUIS, B.A.; SCHULTZ, J.; CRABB, D. Fermentation of *Bacillus*. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics**. Washington, ASM, 1993.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, 31, 488–494, 1968.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 4081-4085, 1996.
- 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**, p. 95-109, 1997.
- BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, 134, 307–319, 2004.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied and Microbiology Biotechnology**, 53, 495-508, 2000.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M. SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45, 493-496, 1966.
- BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5(1), 2002.
- BERNHEIMER, A.W.; AVIGAD, L.S. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, 61, 361-369, 1970.

BESSON, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: Evidence for aminoacid activating enzymes. **Biotechnology Letters**, 14(11), 1013-1018, 1992.

BLENCKE, H.M.; HOMUT, G.; LUDWIG, H.; MÄDER, U.; HECKER, M.; STÜLKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. **Metabolic Engineering**, 5, 133-149, 2003.

BREWER, M.T.; LARKIN, R.P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Crop Protection**, 24, 939-950, 2005.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**, 209, 141-148, 2002.

BRUNER, S.D.; WEBER, T.; KOHLI, R.M.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M.A.; WALSH, C.T.; STUBBS, M. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic Surfactin by the thioesterase domain SrfTE. **Structure**, 10, 301-310, 2002.

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

CARRILLO, C.; TERUEL, J.A.; ARANDA, F.J.; ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1611, 91-97, 2003.

CARVALHO, A.L.U. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Produção de lipopeptídeos e esporos**. Recife, PE, PÓS-BIOTEC/UFPE, 2005, 50p (Dissertação).

CHO, S.; LEE, S.; CHA, B.J.; KIM, Y.H.; SHIN, K.S. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound Iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**, 223, 47-51, 2003.

CLEMENTS, L.D.; MILLER, B.S.; STREIPS, U.N. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. **Systematics and Applied Microbiology**, 25(2), 284-286, 2002.

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**, 42(3), 408-412, 1981.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. **Acta Tropica**, 97(2), 168-173, 2006.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 64:847-67, 2000.

DAVIS, D.A.; LYNCH, 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**, 25, 322–329, 1999.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; JACQUES, P.; THONART, P.; PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 152, 3–10, 1999.

DEUTSCHER, J.; GALINIER, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Carbohydrate uptake and metabolism. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell**. Washington: ASM, 2002.

DRIKS, A. Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. **Trends in Microbiology**, 10(6), 251-254, 2002.

DRIKS, A. The *Bacillus* spore coat. **Phytopathology**, 94 (11), 1249-1251, 2004.

DWORKIN, J.; LOSICK, R. Developmental commitment in a Bacterium. **Cell**, 121, 401–409, 2005.

ELÇİN, Y.M. *Bacillus shpaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. **Enzyme and Microbial Technology**, 17, 587-597, 1995.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Tibtech**, 10, 208-217, 1992.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming Bacteria. **Phytopathology**, 94 (11), 1245-1248, 2004.

GARDENER, B.B.M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, 94 (11), 1252-1258, 2004.

GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. **Methods for general and molecular Bacteriology**. Washington: ASM, 1994.

GOODHUE, C.T.; ROSAZZA, J.P.; PERUZZOTTI, G.P. Methods for transformation of organic compounds. In: DEMAIGN, A.L.; SOLOMON, N.A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: ASM, 1986.

GRAU, A.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1418, 307-319, 1999.

GRAU, A.; ORTIZ, A.; GODOS, A.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. A Biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 377 (2), 315–323, 2000.

HANDELSMAN, J.; EMMERT, E.A.B. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, 171, 1-9, 1999.

HARWOOD, C.R.; CUTTING, S.M. **Molecular biological methods for *Bacillus***. John Wiley & Sons, 1990.

HEERKLOTZ, H.; WIEPRECHT, T.; SEELIG, J. Membrane perturbation by the lipopeptide Surfactin and detergents as studied by Deuterium NMR. **Journal of Physical and Chemistry B**, 108, 4909-4915, 2004.

HIRAOKA, H.; ASAKA, O.; ANO, T.; SHODA, M. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. **Journal of Genetics and Applied Microbiology**, 38, 635-640, 1992.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994.

HOSONO K, SUZUKI H. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase. **Journal of Antibiotics from Japan**, 36, 679-683, 1983.

JACOBSEN, B.J.; ZIDACK, N.K.; LARSON, B.J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. **Phytopathology**, 94(11), 1272-1275, 2004.

JIN, S.; LEVIN, P.A.; MATSUNO, K.; GROSSMAN, A.D.; SONENSHEIN, A.L. Deletion of the *Bacillus subtilis* Isocitrate Dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. **Journal of Bacteriology**, 179(15), 4725-4732, 1997.

KAMEDA, Y.; OUHIRA, S.; MATSUI, K. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. **Chemical and Pharmaceutical Bull**, 22, 938-944, 1974.

KARATAS, A.Y.; ÇETIN, S.; ÖZCENGİZ. The effects of insertional mutations in *comQ*, *comP*, *srfA*, *spo0H*, *spo0A* and *abrB* genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1626, 51-56, 2003.

KIKUCHI, T.; HASUMI, K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis *in vitro* and *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1596, 234-245, 2002.

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB24[®] *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, 1, 172-93, 2000.

KIM, H.S.; YOON, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H.; HO, H.H. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 84(1), 41-46, 1997.

KIM, K.; JUNG, S.Y.; LEE, D.K.; JUNG, J.; PARK, J.K.; KIM, D.K.; LEE, C. Suppression of inflammatory responses by Surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic Phospholipase A₂. **Biochemical Pharmacology**, 55, 975–985, 1998.

KIM, S.; SHIN, B.; CHOI, S.; KIM, C.; PARK, S. Involvement of acetyl phosphate in the *in vivo* activation of the response regulator ComA in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, 195, 179-183, 2001.

KISINGER, R.F.; SHIRK, M.C.; FALL, R. Rapid surface motility and biofilm formation in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. **Journal of Bacteriology**, 185, 5227-5231, 2003.

KLEINKAUF, H.; DÖHREN, H.V.; DORNAVER, H.; NESEMAN, N. **Regulation of secondary metabolite formation**. Germany, VCH, 1986.

KLOEPPER, J. W. 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, 1997.

KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M. Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide. **Colloids and Surfaces B**, 5, 43– 8, 1995.

KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* IXB14-C and Flutolanil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91(2), 173-177, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: MESI, 2001.

KOSARIC, C.N. **Biosurfactants: production, properties, applications**. Canada, Marcel Dekker, 1993.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of Surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, 204, 1–8, 1998.

KRACHT, M.; ROKOS, H.; ÖZEL, M.; KOWALL, M.; PAULI, G.; VATER, J. Antiviral and hemolytic activities of Surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. **The Journal of Antibiotics**, 52(7), 613-619, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles microbial biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 7, 12-20, 2002.

LEIFERT, C.; LI, H.; CHIDBUREE, S.; HAMPSON, S.; WORKMAN, S.; SIGEE, D.; EPTON, H.A.S.; HARBOUR, A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal of Applied Bacteriology**, 78, 97-108, 1995.

LIN, S.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Progress**, 9, 138-145, 1993.

LUNA, C.L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Production of a biocontrol agent for Crucifers Black Rot disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 19(2), 133-140, 2002.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAKA, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of Surfactin on the biological properties of Iturin A. **Biochimie**, 74, 1047-1051, 1992.

MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological physicochemical properties. **Toxicology**, 87(1-3), 151-174, 1994.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied and Microbiology Biotechnology**, 58, 428-434, 2002.

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

MIRELES, JR-H.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, 183, 5848-854, 2001.

MOITA, C.; FEIO, S.V.; NUNVES, L.; CURTO, M.J.M.; ROSEIRO, J.C. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 55, 261-269, 2005.

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**, 48(1), 23-29, 2005.

MORÁN, A.C.; MARTÍNEZ, A.; SIÑERIZ. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. **Biotechnology Letters**, 24, 177-180, 2002.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide Biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1488, 211-218, 2000.

MOYNE, A.; CLEVELAND, T.E.; TUZUN, S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. **FEMS Microbiology Letters**, 234, 43-49, 2004.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133, 183-198, 2005.

NAKANO, M.M.; MARAHIEL, M.A.; ZUBER, P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic Surfactin in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 170(12), 5662-5668, 1988.

NAKANO, M.; ZUBER, P. Cloning and characterization of *surfB*, a regulatory gene involved in Surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 171(10), 5347-5353, 1989.

NAKANO, M.M.; XIA, L.; ZUBER, P. Transcription initiation region of the *surfA* operon, which is controlled by the *com-P-comA* signal transduction system in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 173(17), 5487-5493, 1991a.

NAKANO, M.M.; MAGNUSON, R.; MYERS, A.; CURRY, J.; GROSSMAN, A.D.; ZUBER, P. *surfA* is an operon required for Surfactin production, competence development and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 173(5), 1770-1778, 1991b.

NAKANO, M.M.; HULETT, F.M. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. **FEMS Microbiology Letters**, 157(1), 1-7, 1997.

NAKANO, M.M.; DAILLY, Y.P.; ZUBER, P.; CLARK, D.P. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. **Journal of Bacteriology**, 179(21), 6749-6755, 1997.

NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). **Annual Review of Microbiology**, 52, 165-190, 1998.

NAKANO, M.M.; ZUBER, P.; SONENSHEIN, A.L. Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* Krebs Cycle genes. **Journal of Bacteriology**, 180(13): 3304-3311, 1998.

NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Anaerobiosis. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell**. Washington: ASM, 2002.

NGUGI, H.K.; DEDEJ, S.; DELAPLANE, K.S.; SVELLE, A.T.; SCHERM, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, 33, 32-38, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25(5), 772-776, 2002.

_____. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 31, 63-67, 2003.

PAULI, G.; VOLLENBROICH, D.; ÖZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied Environmental Microbiology**, 63: 44-49, 1997.

PHAE, C. G.; SHODA, M.; KITA, N.; NAKANO, M.; USHIYAMA, K. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. **Annual Phytopathology Japan**, 58, 329-339, 1992.

PHILLIPS, Z.E.V.; STRAUCH, M.A. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 59, 392-402, 2002.

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

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; LABBE, H.; DAS, B.C.; PTAK, M.; MICHEL, G. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the Val⁷-surfactin. **European Journal of Biochemistry**, 202, 101-106, 1991.

PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Controlled biosynthesis of Val⁷- and Leu⁷- surfactins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 36, 515-517, 1992.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51, 553-563, 1999.

PIGGOT, P.J.; HILBERT, D.W. Sporulation in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, 7:1-8, 2004.

QUEIROGA, C.L.; NASCIMENTO, L.R.; SERRA, G.E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34, 321-324, 2003.

RAEYMAEKERS, L.; WUYTACK, E.Y.; WILLEMS, I.; MICHIELS, C.W.; WUYTACH, F. Expression of a P-type Ca²⁺-transport ATPase in *Bacillus subtilis* during Sporulation. **Cell Calcium**, 32(2), 93-103, 2002.

RAMOS, H.C.; HOFFMANN, T.; MARINO, M.; NEDJARI, H.; PRESECAN-SIEDEL, E.; DREESEN, O.; GLASER, P.; JAHN, D. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. **Journal of Bacteriology**, 182(182), 3072-3080, 2000.

RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 639, 81-85, 1993.

REAL, G.; HENRIQUES, A.O. Controlo da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, 68, 2001.

REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology: Products of secondary metabolism**, v.7, Germany, VCH, 1997.

ROGGIANI, M.; DUBNAU, D. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. **Journal of Bacteriology**, 175(10), 3182-3187, 1993.

SACKS, D. B.; BRUNS, D. E.; GOLDSTEIN, D. E.; MACLAREN, N. K.; MCDONALD, J. M.; M. PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of Diabetes Mellitus. **Clinical Chemistry**, 48, 436-472, 2002.

SANTOS, E.R. **Controle biológico da mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***. Recife, PE, PÓS-BIOTEC/UFPE, 2004, 60p (Dissertação).

SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W.; JACKSON, M.A. Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases. **Phytopathology**, 94, 1267-1271, 2004.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. Monitoring surfactant-induced hemolysis by surface tension measurement. **Journal of Colloid and Interface Science**, 255, 265-269, 2002.

SHEPPARD, J.D.; COOPER, D.G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Applied Microbiology Biotechnology**, 35, 72-76, 1991.

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

SING, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, 22(3), 2004.

SONENSHEIN, A.L. The Krebs citric acid cycle. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell**. Washington: ASM, 2002.

SPIILIMBERGO, S.; BERTUCCO, A.; LAURO, F.M.; BERTOLONI, G. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 4, 161-165, 2003.

STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D.; MARAHIEL, M.A. Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell**. Washington: ASM, 2002.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 2005.

STROHL, W.R. **Biotechnology of antibiotics**. 2.ed., Nova York, Marcel Dekker, 1997.

SYMMANK, H.; FRANKE, P.; SAENGER, W.; BERNHARD, F. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. **Protein Engineering**, 15(11), 913-921, 2002.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; DANA-MAGET, R.; MICHEL, G. Surface-active properties on antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. **JAOCS**, 69(1), 92-93, 1992.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, G. Ionophorous and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Colloides and Surfaces B: Biointerfaces**, 1(1), 57-62, 1993.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Arte Médicas, 2000. 827p.

TSUNGE, K.; AKIYAMA, T.; SHODA, M. Cloning, sequencing, and characterization of the Iturin A operon. **Journal of Bacteriology**, 21, 183, 6265-6273, 2001.

VASS, E.; BESSON, F.; MAJER, Z.; VOLPON, L.; HOLLÓSI, M. Ca⁺²-Induced changes of Surfactin conformation: A FTIR and circular dichroism study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 282, 361-367, 2001.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass Spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied Environmental Microbiology**, 68 (12), 6210-6219, 2002.

VEPACHEDU, V.R.; SETLOW, P. Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature sensitive *spo* mutations in the *spoVA* operon. **FEMS Microbiology Letters**, 239, 71-77, 2004.

VOLLENBROICH, D.; ÖZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, 25, 289-297, 1997.

WEI, Y.; CHU, I. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, 22, 724-8, 1998.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of Prokaryotes**. 2.ed. Oxford University Press, 2000.

WULFF, E.G.; MGUNI, C.M.; MANSFELD-GIESE, K.; FELS, J.; LÜBECK, M.; HOCKENHULL, J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**, 51, 574-584, 2002.

YE, R.W.; TAO, W.; BEDZYK, L.; YOUNG, T.; CHEN, M.; LI, L. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. **Journal of Bacteriology**, 182(16): 4458-4465, 2000.

YU, G.Y.; SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L.; BERTAGNON, B.L. Production of Iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology & Biochemistry**, 34, 955-963, 2002.