

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TESE**

**Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de-açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**

**Marcela Motta Drechsel**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ANTIBIOSE DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* CONTRA BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS E FITOPATOGÊNICA DE CANA-DE-AÇÚCAR E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA  
SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS ANTAGÔNICAS**

**MARCELA MOTTA DRECHSEL**

*Sob a orientação do pesquisador*  
**José Ivo Baldani**

*e coorientação da pesquisadora*  
**Marcia Soares Vidal**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Fitotecnia**, no curso de Pós-Graduação  
em Fitotecnia, Área de Concentração em  
Fisiologia da Produção

Seropédica, RJ  
Abril de 2011

Drechsel, Marcela Motta

Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de-açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas / Marcela Motta Drechsel - 2011

114 f. :grafs., tabs.

Orientador: Jose Ivo Baldani e Márcia Soares Vidal

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia.

Referências: f. 96-112

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MARCELA MOTTA DRECHSEL

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

José Ivo Baldani. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Fábio Lopes Olivares. Dr. UENF

---

Silvia Regina Goi. Dr. UFRRJ

---

Paulo Sergio Torres Brioso. Dr. UFRRJ

---

Stefan Schwab. Dr. Embrapa Agrobiologia

Para Dagoberto Grohs Drechsel, meu pai, meu herói.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por nunca ter me deixado na mão quando eu pedi uma ajudinha, por me proporcionar o prazer em trabalhar com que gosto e principalmente por me dar o privilégio de ser filha e neta de quem sou.

À minha mãe, pelos momentos de ternura e brincadeira, por aguentar minhas crises com a tese e por ser o meu verdadeiro porto seguro.

Ao meu pai, por ser meu maior exemplo de vida e por corrigir meus erros gramaticais.

À minha querida filha Luna por sempre melhorar minha auto-estima e pelos momentos de carinho.

Ao meu namorado Marcelo, pelo amor incondicional no sentido mais puro da palavra.

À Vera Baldani, minha mãe científica, a que me abriu todas as portas e me mostrou a direção.

Aos meus orientadores José Ivo Baldani e Marcia Soares Vidal, pelas broncas merecidas, pelas orientações impecáveis, pela disponibilidade em me escutar e resolver inúmeros problemas, pelas palavras amigas na hora mais crítica de minha vida acadêmica e por apesar de tudo isso, ainda acreditar em mim.

Ao Carlos Henrique Gadelha Meneses, companheiro e cúmplice de todas as horas, por estar presente em todos os momentos nestes quatro anos de luta sendo meu braço direito e esquerdo tanto na vida pessoal quanto na profissional; pela ajuda na parte de Biologia Molecular e Bioinformática.

À analista Patricia Gitahy, sempre disponível nas horas necessárias.

A todos meus queridos colegas do laboratório de Genética e Bioquímica e Gramineas.

Aos meus amigos Anita, Helma, Cleiton, Luc, Sylvia e Tatiana pela grande amizade e carinho que ultrapassou em muito os muros da Embrapa Agrobiologia.

A ajuda indispensável do Geraldo, Lúcio, Wilson, Carlos Chaves, Claudinho e seu Marildo.

À professoras Gorete e Regina do curso de pós-graduação em Fitotecnia.

Ao meu querido Dindo, por me mostrar que estar presente independe do corpo físico.

Às minhas queridas Dinda e Omama, pelos momentos de confidências, orações e pelos bolos de maçã e sopas de batata.

À minha tia Sueli, pelos conselhos profissionais.

Aos meus queridos amigos Rubens, Celina, Adriana, Tainara, Arthur, David pelos momentos de cumplicidade e confidências

À todos os membros da Embaixada Atleticana do RJ pelos momentos de descontração.

### **E agora, José?**

A festa acabou,  
a luz apagou,  
o povo sumiu,  
a noite esfriou,  
e agora, José ?  
e agora, você ?  
você que é sem nome,  
que zomba dos outros,  
você que faz versos,  
que ama protesta,  
e agora, José ?

Está sem mulher,  
está sem discurso,  
está sem carinho,  
já não pode beber,  
já não pode fumar,  
cuspir já não pode,  
a noite esfriou,  
o dia não veio,  
o bonde não veio,  
o riso não veio,  
não veio a utopia  
e tudo acabou  
e tudo fugiu  
e tudo mofou,  
e agora, José ?

E agora, José ?  
Sua doce palavra,  
seu instante de febre,  
sua gula e jejum,  
sua biblioteca,  
sua lavra de ouro,  
seu terno de vidro,  
sua incoerência,  
seu ódio - e agora ?

Com a chave na mão  
quer abrir a porta,  
não existe porta;  
quer morrer no mar,  
mas o mar secou;  
quer ir para Minas,  
Minas não há mais.  
José, e agora ?

Se você gritasse,  
se você gemesse,  
se você tocasse  
a valsa vienense,  
se você dormisse  
se você cansasse,  
se você morresse...  
Mas você não morre,  
você é duro, José !

Sozinho no escuro  
qual bicho-do-mato,  
sem teogonia,  
sem parede nua  
para se encostar,  
sem cavalo preto  
que fuja a galope,  
você marcha, José !

José, pra onde ?

**Carlos Drummond de Andrade**

## RESUMO

DRECHSEL, Marcela Motta. **Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de-açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas.** 2011. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A utilização de microrganismos endofíticos em inoculantes de cana-de-açúcar, pode, além de ajudar a diminuir a necessidade de aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados, atuar no controle biológico de fitopatógenos na cultura. Além disso, torna-se necessário o estudo de antagonismo entre as estirpes que compõem o inoculante para elucidar suas interações no inoculante a fim de contribuir com todo o potencial biotecnológico. A partir disso, o antagonismo *in vitro* da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* foi avaliada contra as bactérias que compõem o inoculante de cana-de-açúcar desenvolvido pela Embrapa (*Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia tropica*), como também contra a bactéria *Xanthomonas albilineans*, agente etiológico da escaldadura das folhas. A metodologia empregada foi a de antibiose por dupla camada, em que a estirpe PAL5<sup>T</sup> foi inoculada em pontos equidistantes seguido da adição de uma sobrecamada contendo meio fundente e a cultura líquida da bactéria a ser inibida. Agentes indutores da síntese de substâncias antagônicas como radiação UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram aplicados nas culturas líquidas de PAL5<sup>T</sup> antes de serem incubadas em placas. Os resultados mostraram a necessidade de indução da síntese de bacteriocina por um agente externo como irradiação ultravioleta ou peróxido de hidrogênio, tanto para a inibição de *X. albilineans* quanto para *H. rubrisubalbicans*. As demais bactérias que compõem o inoculante não foram inibidas pela estirpe PAL5<sup>T</sup> nem quando foram submetidas à radiação UV ou ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Num segundo estudo, objetivou-se identificar possíveis genes relacionados à produção de compostos antimicrobianos no genoma da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus*. Dois mutantes sítio-dirigidos defectivos na síntese e no transporte de bacteriocina foram construídos a partir da incorporação de um elemento de transposição nas ORFs GDI\_0415 e GDI\_3499, respectivamente. A ORF GDI\_0415 foi anotada como uma bacteriocina denominada Linocina M18 enquanto a GDI\_3499 foi anotada como um transportador ABC. A avaliação do antagonismo da estirpe selvagem e dos mutantes foi realizada pela metodologia de antibiose por dupla camada, como descrita anteriormente. O mutante defectivo para o transporte de bacteriocina apresentou resultados idênticos aos da estirpe selvagem. O mutante para a síntese de bacteriocina não apresentou atividade antagônica contra o fitopatógeno, mesmo no tratamento com exposição à UV. Os resultados sugerem que essa bacteriocina (Linocina M18) é a responsável pelo antagonismo de *X. albilineans*.

**Palavras-chave:** inoculante, antagonismo, controle biológico.

## ABSTRACT

DRECHSEL, Marcela Motta. **Antibiosis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against diazotrophic and phytopathogenic bacteria of sugarcane and molecular characterization of genes involved in the synthesis of antagonistic substances**, 2011. Thesis (Doctor of Science in Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The use of endophytic diazotrophic microorganisms in a sugar cane inoculant may help to decrease the need for nitrogen fertilizer application and in addition may act as biological control agent against pathogens in the crop. Moreover, the antagonism study among these strains may help to elucidate their interactions during the inoculant uses as well as to explore the biotechnological potential. For this, an *in vitro* antagonism study involving the PAL5<sup>T</sup> strain was carried out against the bacteria from the sugarcane inoculant developed by Embrapa (*Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Burkholderia tropica*). In addition, this strain was also tested against *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald. A double- agar layer method was used with PAL5<sup>T</sup> strain inoculated at equidistant points of the plates and an overlayer containing liquid culture medium of the bacterium to be inhibited was added. Agents that can induce antagonism, like UV radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as inductors in PAL5<sup>T</sup> liquid cultures. The induction of bacteriocin synthesis by an external agent such as ultraviolet irradiation or hydrogen peroxide was required to inhibit *X. albilineans* and *H. rubrisubalbicans*. The other bacteria were not inhibited by PAL5<sup>T</sup> grown in the same conditions. In addition, it was studied the role played by the genes possible involved in the production of antimicrobial compounds by the PAL5<sup>T</sup> strain. Two site-directed mutants defective in synthesis and transport of bacteriocin were constructed with the incorporation of the Tn5 in GDI\_0415 and GDI\_3499 ORFs, respectively. The ORF GDI\_0415 was anoted as a bacteriocin named Linocina M18 while GDI\_3499 was anoted as an ABC transporter. The antagonism of the wild-strain and mutants was analyzed by double- agar layer method as previously described. The mutant defective for bacteriocin transport produced the same phenotype as the wild-type strain. The bacteriocin mutant did not show antagonistic activity against the phytopathogen even after UV exposition, suggesting that the bacteriocin (Linocina M18) is responsible for the antagonism against *X. albilineans*.

**Keywords:** inoculant, antagonism, biological control.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cana-de-açúcar	18
<b>Figura 2:</b> Evolução da produção mundial de açúcar	19
<b>Figura 3:</b> Regiões brasileiras produtoras de cana-de-açúcar	19
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da biossíntese de bacteriocina	27
<b>Figura 5:</b> Formação de poros membranares ocasionados por bacteriocinas	28
<b>Figura 6:</b> Modo de ação da colicina	29
<b>Figura 7:</b> Controle biológico do agente etiológico da galha-de-coroa da videira pela estirpe não patogênica (VAR03-1) de <i>Rhizobium vitis</i>	30
<b>Figura 8:</b> Antagonismo da estirpe PAL5 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra a estirpe ICMP 196 de <i>Xanthomonas albilineans</i> aplicada em sobrecamada	40
<b>Figura 9:</b> Antagonismo da estirpe PAL5 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra a estirpe ICMP 196 de <i>Xanthomonas albilineans</i>	41
<b>Figura 10:</b> Efeito do tempo de exposição à radiação ultravioleta sobre a indução da síntese de substâncias antagônicas em suspensão bacteriana de <i>G. diazotrophicus</i> contra <i>X. albilineans</i>	43
<b>Figura 11:</b> Efeito do tempo de exposição à radiação ultravioleta do extrato celular de <i>G. diazotrophicus</i> sobre a indução da síntese de substâncias antagônicas contra a bactéria <i>X. albilineans</i>	44
<b>Figura 12:</b> Avaliação da indução da atividade antagônica por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em diferentes concentrações (0, 25, 100 e 500 µM) na síntese de substâncias antagônicas contra <i>X. albilineans</i>	46
<b>Figura 13:</b> Antagonismo de <i>G. diazotrophicus</i> contra as bactérias que compõem o inoculante, sendo as estirpes: A: HRC54 de <i>H. seropedicae</i> , B: HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i> , C: CBAmC de <i>A. amazonense</i> e D: PPe8 de <i>B. tropica</i>	48
<b>Figura 14:</b> Antagonismo de <i>G. diazotrophicus</i> expostas à radiação UV por 20 minutos contra as bactérias que compõem o inoculante, sendo as estirpes: A: HRC54 de <i>H. seropedicae</i> , B: HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i> , C: CBAmC de <i>A. amazonense</i> e D: PPe8 de <i>B. tropica</i>	49
<b>Figura 15:</b> Avaliação da indução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em diferentes concentrações (0, 25, 100 e 500 µM) na síntese de substâncias antagônicas contra a estirpe HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i>	50
<b>Figura 16:</b> Desenho esquemático de clonagem e inativação para as ORFs GDI_0415 e GDI_3499 pela inserção de transposon Tn5	59

<b>Figura 17:</b> Alinhamento da bacteriocina de <i>G. diazotrophicus</i> com os atribuídos a partir de proteínas da mesma família em outras bactérias	67
<b>Figura 18:</b> Alinhamento do transportador de bacteriocina de <i>G. diazotrophicus</i> com os atribuídos a partir de proteínas da mesma família em outras bactérias	69
<b>Figura 19:</b> Sistema de secreção ABC	72
<b>Figura 20:</b> Predição da estrutura secundária da linocina M18	73
<b>Figura 21:</b> Predição da estrutura secundária do transportador de bacteriocina	74
<b>Figura 22:</b> Topologia das prováveis regiões transmembrânicas da bacteriocina transcrita pela ORF GDI_0415 de <i>G. diazotrophicus</i>	75
<b>Figura 23:</b> Momento hidrofóbico em relação aos resíduos da linocina M18 da <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	75
<b>Figura 24:</b> Topologia das prováveis regiões transmembrânicas do transportador de bacteriocina transcrita pela ORF GDI_3499 de <i>G. diazotrophicus</i>	76
<b>Figura 25:</b> Momento hidrofóbico em relação aos resíduos do transportador de bacteriocina da <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	76
<b>Figura 26:</b> Árvore filogenética dos genes que codificam a bacteriocina linocina M18 dos organismos analisados	77
<b>Figura 27:</b> Árvore filogenética dos genes que codificam a o transportador de bacteriocina dos organismos analisados	78
<b>Figura 28:</b> Visualização das ORFs GDI_0415 que codifica a bacteriocina da família Linocina M18 e GDI_3499, que codifica um transportador de bacteriocina	79
<b>Figura 29:</b> Visualização em gel de agarose dos fragmentos de bacteriocinas (GDI_0415) clonados no plasmídeo pGEM-T Easy em células DH10B de <i>E.coli</i> (extração plasmidial)	79
<b>Figura 30:</b> Visualização em gel de agarose dos fragmentos do transportador de bacteriocina (GDI3499) clonados no plasmídeo pGEM-T Easy em células DH10B de <i>E. coli</i> (extração plasmidial)	80
<b>Figura 31:</b> Visualização em gel de agarose da digestão dos fragmentos de bacteriocina (GDI_0415) e do transportador de bacteriocina (GDI_3499) os quais foram inseridos o transposon TN5	81

- Figura 32:** Representação do sítio de inserção do transposon Tn5 no genoma da estirpe mutante para ORF GDI\_0415 (A) e GDI\_3499 (B) a partir das reações de sequenciamento 83
- Figura 33:** Perfis de amplificação por PCR de colônia da ORF GDI\_0415 em estirpes selvagem e mutante de *G. diazotrophicus* 83
- Figura 34:** Perfis de amplificação por PCR de colônia da ORF GDI\_3499 em estirpes selvagem e mutante de *G. diazotrophicus* 84
- Figura 35:** Produtos gerados por PCR invertido, do material genômico digerido com a enzima de restrição *Pst*I 84
- Figura 36:** Representação do sítio de inserção do transposon Tn5 no genoma da estirpe mutante MGD a partir das reações de sequenciamento 85
- Figura 37:** Curva de crescimento da estirpe selvagem PAL5 e dos mutantes para síntese e transporte de bacteriocina (GDI\_0415 e GDI\_3499, respectivamente) em meio DYGS por até 48 horas 85
- Figura 38:** Quantificação colorimétrica de auxinas no sobrenadante de estirpes mutantes e selvagem de *G. diazotrophicus* cultivadas em meio de cultura LGI-P na presença de triptofano 87
- Figura 39:** Visualização da película aerotática formada por *G. diazotrophicus* após 4 dias de incubação a 30°C em meio LGI-P semissólido 88
- Figura 40:** Atividade de nitrogenase das estirpes selvagem e mutantes de PAL5 e em meios LGI-P semissólido, medida pela técnica de redução de acetileno. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre diferentes coletas no mesmo indivíduo 88
- Figura 41:** Atividade de nitrogenase das estirpes selvagem e mutantes de PAL5 e em meios LGI-P semissólido medida pela técnica de redução de acetileno 89
- Figura 42:** Antagonismo da estirpe selvagem e mutantes de PAL5 contra *X. albilineans* sob indução da luz ultravioleta por 20 minutos 90
- Figura 43:** Avaliação da indução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) na síntese de substâncias antagônicas na estirpe selvagem de PAL5 e os mutantes MUT GDI\_0415 e MUT GDI\_3499 de *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans* 91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Produção em toneladas (T) das principais culturas tropicais	18
<b>Tabela 2:</b> Análise dos parâmetros de crescimento de estirpes de <i>G. diazotrophicus</i> na fase exponencial do crescimento em meio de cultivo DYGS	86

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

®	Marca registrada
TM	Marca registrada
Amp <sup>R</sup>	Resistente à Ampicilina
Amp <sup>S</sup>	Sensível à Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DTT	ditiotreitól
D.O.	Densidade ótica
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EtBr	Brometo de Etídio
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
IPTG	Isopropil β-Dtiogalactosídeo
Km <sup>R</sup>	Resistentes à Canamicina
Km <sup>S</sup>	Sensível à Canamicina
LB	Meio Luria-Bertani
ORF	Fase Aberta de Leitura
PAL5	Estirpe selvagem de <i>G. diazotrophicus</i>
pv.	Patovar
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SPCPs	Substâncias promotoras de crescimento das plantas
ssp.	Subespécie
TAE	Tris Acetato EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia
var.	Variedade
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-Dgalactosídeo

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I: Atividade antagônica da estirpe pal5<sup>t</sup> de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra as estirpes do inoculante de cana-de-açúcar e a bactéria fitopatogênica <i>xanthomonas albilineans</i></b>	<b>32</b>
<b>RESUMO</b>	<b>33</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>34</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
1. Teste de antagonismo da estirpe PAL5 <sup>T</sup> de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra a estirpe ICMP 196 de <i>Xanthomonas albilineans</i>	37
2. Teste de antagonismo da estirpe PAL5 <sup>T</sup> de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar	39
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
1. Teste de antagonismo da estirpe PAL5 <sup>T</sup> de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra a estirpe ICMP 196 de <i>Xanthomonas albilineans</i>	40
2. Teste de antagonismo da estirpe PAL5 <sup>T</sup> de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar	47
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO II: Caracterização de mutantes defectivos em genes que codificam a bacteriocina do tipo linocina M18 e um transportador de bacteriocina em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> estirpe PAL5<sup>T</sup></b>	<b>52</b>
<b>RESUMO</b>	<b>53</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>54</b>

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>55</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
1. Obtenção das sequências de aminoácidos relacionados à bacteriocina e sua regulação	57
2. Predição da estrutura secundária, regiões transmembranares e análise filogenética da bacteriocina e do seu respectivo transportador	57
3. Construção dos mutantes sítio-dirigidos para bacteriocina e seu transportador	57
4. Caracterização genotípica dos mutantes sítio-dirigidos que codificam a bacteriocina linocina M18 e um transportador de bacteriocina em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	62
5. Caracterização fenotípica dos mutantes sítio-dirigidos que codificam a bacteriocina linocina M18 e um transportador de bacteriocina em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	64
6. Teste de antagonismo da estirpe selvagem e mutantes para produção e transporte de bacteriocina de <i>G. diazotrophicus</i> contra a estirpe ICMP 196 de <i>Xanthomonas albilineans</i>	66
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
1. Obtenção das sequências de aminoácidos relacionados à bacteriocina e sua regulação	67
2. Predição da estrutura secundária, regiões transmembranares e análise filogenética da bacteriocina e transportador de bacteriocina selecionado	73
3. Construção dos mutantes sítio-dirigidos para bacteriocina e seu transportador	79
4. Caracterização molecular dos mutantes insercionais	82
5. Caracterização fenotípica dos mutantes sítio-dirigidos que codificam a bacteriocina linocina M18 e um transportador de bacteriocina em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	84
6. Teste de antagonismo da estirpe selvagem e mutantes de síntese e transporte de bacteriocina de <i>G. diazotrophicus</i> contra a estirpe ICMP 196 de <i>Xanthomonas albilineans</i>	89
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>91</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>111</b>

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com mais de 8.442,8 mil hectares de área plantada e produção anual de 641.982 mil toneladas (CONAB, 2011). Sua importância é devida a sua utilização na fabricação de aguardente, açúcar e álcool e à geração de energia.

Dentre os fatores que afetam negativamente a produtividade da cana-de-açúcar, um dos mais prejudiciais é a ocorrência de pragas e doenças. Destas, as de causa bacteriana de maior relevância nas regiões canavieiras do mundo são: o raquitismo-da-soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é a escaldadura das folhas, cujo agente etiológico é *Xanthomonas albilineans* (RICAUD et al., 1989). As duas doenças se caracterizam pela difícil diagnose e controle, já que não existem medidas fitossanitárias eficazes no seu controle efetivo (ROSS, 2004).

O controle biológico ou biocontrole pode ser feito alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento da doença, ou utilizando microrganismos com propriedades antagônicas aos patógenos (RICAUD et al., 1989). Microrganismos endofíticos no controle biológico de doenças fúngicas e bacterianas têm sido consistentemente utilizados como alternativa, porque esses microrganismos habitam um nicho ecológico semelhante ao ocupado por fitopatógenos, podendo-se assim controlá-los por competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira; por produção de compostos antimicrobianos (substâncias antagônicas) e por indução de resistência sistêmica (BLANCO et al., 2005).

Segundo Misaghi e Donndelinger (1990), bactérias endofíticas possuem uma íntima relação com seus hospedeiros por meio de processos coevolutivos e podem ter influência na fisiologia das plantas por mecanismos ainda não completamente elucidados. Comprovadamente, bactérias endofíticas podem conferir ao seu hospedeiro características como maior resistência a condições de estresse e doenças, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nutrientes, produção de reguladores de crescimento vegetal, além de fixar nitrogênio para as plantas (MISAGHI, DONNDELINGER, 1990; BASTIÁN et al., 1988; BALDANI, BALDANI, 2005). Com o advento da biologia molecular, esses microrganismos também podem ser modificados geneticamente e introduzidos no hospedeiro, conferindo-lhe características desejáveis (SALES et al., 2000).

Nas últimas décadas, inúmeros isolados de bactérias endofíticas (principalmente as espécies do gênero *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*) associadas à cana-de-açúcar, todas fixadoras de nitrogênio, têm sido testados quanto ao seu potencial de contribuição na nutrição nitrogenada em ensaios experimentais (SARAVANAN et al., 2007). Entretanto, apesar da potencialidade da cultura na geração de divisas para o país e da clara demanda por tecnologias alternativas de produção na agricultura mundial, que ampliariam a importância das pesquisas sobre a população de microrganismos que a colonizam, poucos estudos foram realizados para a avaliação dos possíveis efeitos da utilização desses microrganismos endofíticos no controle biológico de suas principais doenças (CARNEIRO JR, 2006; da SILVA, 2009).

A compreensão do papel da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* e de sua associação com a cana-de-açúcar, assim como a identificação de genes associados à síntese de bacteriocinas, pode servir como ferramenta para otimizar o seu potencial agrícola para a possível produção de inoculantes capazes não só de reduzir a aplicação de fertilizantes nitrogenados como também ser um agente de controle biológico dessa cultura. O uso de banco de dados gerados pelo projeto genoma de cana-de-açúcar e de *G. diazotrophicus* permitirá a produção do inoculante tendo como diferencial a aplicação do conhecimento disponível sobre as vias metabólicas para a produção de fitohormônios, os mecanismos de regulação da expressão da FBN e sinais moleculares envolvidos no processo do controle dos patógenos já mencionados.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (Figura 1) foi descrita por Linneu (1753), no livro *Specie Plantarum*, como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*, e, posteriormente, sofreu inúmeras alterações (CESNIK e MIOCQUE, 2004). Pertence à família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. O gênero possui várias espécies, porém sua classificação mais aceita contempla as *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (BARBOSA, 2000).



**Figura 1:** Cana-de-açúcar (Embrapa Monitoramento por Satélite, 2011).

De todas as culturas ligadas à produção de açúcar, a cana-de-açúcar é a maior mundialmente (Figura 2 e Tabela 1), contribuindo com cerca de 60% a 70% de todo o açúcar produzido (INGELBRECHT et al., 1999) e com uma das maiores produções de biomassa entre as espécies cultivadas (MA et al., 2000).

**Tabela 1:** Produção de biomassa em toneladas das principais culturas tropicais

Cultura	Nome Científico	Produção (ton.)
Cana-de-açúcar	<i>Saccharum sp.</i>	1.682.577.768
Milho	<i>Zea mays</i>	817.110.509
Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	329.556.911
Mandioca	<i>Manihot esculenta</i>	240.989.481
Tomate	<i>Manihot esculenta</i>	141.400.629
Batata-doce	<i>Ipomoea batatas</i>	107.642.391
Melancia	<i>Citrullus lanatus</i>	100.687.056
Banana	<i>Musa paradisiaca</i>	95.595.965
Algodão (semente)	<i>Gossypium hirsutum</i>	64.002.158
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	62.098.620
Inhame	<i>Dioscorea sp.</i>	54.098.112
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	39.320.705
Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i>	35.520.257
Berinjela	<i>Solanum melongena</i>	35.326.379
Manga	<i>Mangifera indica</i>	35.035.641
Milheto	<i>Pennisetum glaucum</i>	32.034.572
Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	19.723.330
Abacaxi	<i>Ananas comosus</i>	18.448.674

Fonte (FAO, 2010)



No Brasil, a indústria canavieira mantém o maior sistema de produção de energia comercial de biomassa do mundo, por meio do etanol (substituindo em cerca de 20% o consumo da gasolina como combustível) e do uso do bagaço (equivalente a 11 milhões de toneladas de óleo). O etanol pode ser uma fonte alternativa para a resolução da questão energética. Além disso, a indústria canavieira contribui para a produção de plásticos biodegradáveis, açúcares não calóricos, compostos químicos de interesse farmacêutico, além de ser responsável por milhões de empregos e geração de divisas para o país por meio da exportação de açúcar, álcool e, pelo aproveitamento racional da biomassa vegetal, gerando energia elétrica e produtos para a indústria e para a agropecuária (RAIZER, 1998). Um de seus produtos, o bagaço, é capaz de gerar excedentes de cerca de três quilowatts/tonelada de energia elétrica. Entretanto, com a utilização de parte da palha e de tecnologias mais eficientes, esse potencial poderia ser elevado para cinco quilowatts, aumentando ainda mais a importância econômica da cultura (SACIOTO, 2003).

## **1.1 Doenças**

Dentre os vários fatores limitantes à produção de cana-de-açúcar, destacam-se a ocorrência e a severidade de doenças, que se constituem em importantes justificativas para a substituição de variedades, devido ao decréscimo de produtividade provocado por elas. No Brasil, foram relatadas 40 das 177 doenças relacionadas à cana-de-açúcar em todo o mundo (SANGUINO, 1998). Historicamente, das doenças que afetam a cultura da cana-de-açúcar, quatro são consideradas de expressão: carvão, raquitismo das soqueiras, escaldadura das folhas e mosaico da cana-de-açúcar (SANTOS, 2005). Outras doenças como a estria vermelha e a gomose, também foram registradas e, dependendo da região e condições ambientais, podem provocar prejuízos (SANTOS, 2005).

### **1.1.1 Doença da Escaldadura das folhas**

A escaldadura das folhas é uma doença provocada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, sendo uma das doenças mais importantes no setor canavieiro (SANTOS, 2005). Foi primeiramente relatada em 1920 e, desde então, já foi constatada em pelo menos 55 países (COMSTOCK e LENTINI, 2002). Essa doença tem grande potencial destrutivo, principalmente em variedades suscetíveis. No Brasil, sua importância tem sido subestimada devido aos erros de identificação e à confusão de seus prejuízos com aqueles causados pelo raquitismo das soqueiras (TOKESHI, 1997). Quando a doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, pode causar perdas de até 100%. Seus prejuízos manifestam-se, principalmente, na má formação dos toletes no plantio, morte das touceiras, queda na produção e na riqueza de sacarose (SANTOS, 2005).

A sintomatologia dessa doença é bem complexa, uma vez que são conhecidos três tipos de sintomas. O primeiro tipo é o latente, que aparece na maioria das variedades comerciais. Na planta, mesmo com a presença do patógeno, os sintomas externos não se manifestam, permitindo que as variedades possam ser usadas por muitos anos. Internamente, nos colmos, observa-se, ocasionalmente, descoloração vascular na região dos nós, assemelhando-se aos sintomas do raquitismo das soqueiras. Um segundo tipo de sintoma é o chamado crônico, que se caracteriza pelo surgimento de diversos sintomas externos, sendo o mais característico o das estrias brancas no limbo foliar, podendo atingir a bainha. Por último, o sintoma agudo, observado nas variedades mais suscetíveis e com condições favoráveis ao patógeno. Caracteriza-se pela queima total das folhas, como se a planta tivesse sido escaldada, daí a origem do nome da doença. A bactéria sobrevive em plantas infectadas, sendo disseminada na colheita. É possível a sua disseminação também por outras práticas culturais que provoquem ferimentos nos colmos (TOKESHI, 1997). Com o incremento da colheita mecanizada, as preocupações com essa doença aumentam. Daí a importância em se manter o canavial sadio. A bactéria também pode infectar plantios de milho próximos ao canavial, uma vez que ela pode ser facilmente transportada por ventos e chuvas (SANTOS, 2005).

A principal forma de controle dessa doença é o uso de variedades resistentes e tolerantes ao patógeno. Entretanto, devido aos sintomas latentes da escaldadura, deve-se ter atenção com as

variedades, principalmente com as tolerantes. No caso de emprego de variedades tolerantes, torna-se necessário tomar alguns cuidados: evitar plantio de mudas provenientes de campos com a doença; preparo das áreas de viveiros para eliminar bactérias do solo e restos de cultura; desinfecção de equipamentos e ferramentas utilizadas no manejo da cultura. Quanto ao tratamento térmico de mudas, existem controvérsias em relação a sua utilização. O tratamento utilizado para controle do raquitismo das soqueiras não é eficiente para a escaldadura das folhas. Comstock e Lentini (2002) afirmam que, por meio desse tratamento, o controle é apenas parcial. Dessa forma, eles recomendam que o tratamento seja feito por meio da imersão de mudas por um longo tempo em água quente. Na Austrália, as mudas são expostas por 24 horas a um fluxo de água contínuo, sendo em seguida mergulhadas por três horas a 50°C. Não é conhecido até o momento qualquer produto, químico ou biológico, que controle satisfatoriamente esse patógeno.

## 2. Fixação Biológica de Nitrogênio em bactérias endofíticas

O nitrogênio ( $N_2$ ) é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, porém se encontra indisponível às plantas devido a sua estabilidade molecular, fazendo-se necessária sua adição ao solo pelo uso de fertilizantes. Além disso, principalmente em solos tropicais, grande parte do nitrogênio existente no solo é perdida pelos processos de lixiviação, desnitrificação e pela imobilização microbiana. Portanto, é de extrema importância a nutrição equilibrada aliada a práticas culturais que visem a um sistema de controle integrado, minimizando os gastos com adubação e tornando a agricultura economicamente viável e mais competitiva, reduzindo as perdas e a poluição ambiental (SALA et al., 2008).

A cultura da cana-de-açúcar requer uma grande quantidade de nitrogênio. Assim, para alcançar uma produtividade com cerca de 100 ton.ha<sup>-1</sup> de colmos, deve-se acumular aproximadamente 180-250 kg.ha<sup>-1</sup> de N em sua parte aérea (XAVIER, 2002). Segundo Urquiaga et al. (1992), as quantidades de N-fertilizante aplicadas não ultrapassam a dose de 80 kg.ha<sup>-1</sup> de N em média, e o restante do nitrogênio necessário à cultura é proveniente de duas fontes principais: o N do solo e o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

A FBN é um processo bioquímico em que certos microrganismos denominados diazotróficos convertem o  $N_2$  atmosférico em amônia ( $NH_3$ ), que será incorporada em componentes orgânicos nas células dos vegetais na forma de proteínas, ácidos nucléicos, dentre outras biomoléculas. Ao lado da fotossíntese, a FBN é provavelmente um dos processos biológicos mais importantes que ocorrem na natureza (ELMERICH; NEWTON, 2007). Os primeiros estudos envolvendo a FBN no Brasil em plantas não leguminosas foram realizados por Döbereiner na década de 50 (revisto por BALDANI; BALDANI, 2005). Já em 1953, Döbereiner observou a ocorrência de *Azotobacter* em solos da baixada fluminense (DÖBEREINER, 1953 citado por BALDANI; BALDANI, 2005). A presença de bactérias residentes em tecidos de plantas saudáveis foi observada pela primeira vez em 1926 (HALLMANN et al., 1997).

Os nomes “endozosférico” e “endofítico” foram então utilizados para descrever esse tipo particular de associação bactéria-planta que não causa sintomas na planta (DÖBEREINER, 1992; REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). O frequente isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes a grupos que não sobrevivem livres em amostras de solos, raízes e colmos esterilizados, mas sim no interior das plantas, levaram Döbereiner e coautores a definir um novo tipo de interação bactéria-planta envolvendo bactérias diazotróficas endofíticas (DÖBEREINER, 1992; DÖBEREINER et al., 1993).

Atualmente, o termo endofítico é utilizado para microrganismos associados à planta capazes de colonizar intercelularmente seus tecidos internos sem ocasionar nenhum tipo de dano aparente ou ameaça ecológica ao hospedeiro (ELMERICH, 2007). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia sp.* são as bactérias endofíticas mais bem caracterizadas em cana-de-açúcar (DE CARVALHO et al., 2011). No entanto, mais estudos sobre a seleção de estirpes de bactérias endofíticas diazotróficas competitivas

necessitam ser realizados para se obter o máximo de benefício desta associação na cultura de cana-de-açúcar.

Muitos trabalhos já foram realizados avaliando o incremento de nitrogênio na cana-de-açúcar por bactérias endofíticas. Sevilla et al. (2001) inocularam a estirpe PAL5<sup>T</sup> e um mutante (defectivo na transcrição da enzima nitrogenase) de *G. diazotrophicus* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. No tratamento sem a utilização de fertilizantes nitrogenados, as plantas mostraram um aumento significativo na matéria seca e na acumulação de N total após 60 dias de crescimento em casa de vegetação. Quando essas plantas foram incorporadas em condições de campo, após quatro meses, as plantas inoculadas com a estirpe selvagem tiveram um acréscimo de 40% de peso fresco no colmo e 42% de peso fresco nas folhas em comparação com as plantas inoculadas com o mutante. Já Oliveira et al. (2002) avaliaram oito inoculantes contendo diferentes misturas das bactérias *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*. Após a inoculação e aclimatização, as plantas foram transferidas para vasos contendo o solo enriquecido com <sup>15</sup>N. Após 400 dias de crescimento em condições de campo, as plantas inoculadas com todas as espécies e as inoculadas com ambas do gênero *Herbaspirillum* acarretaram em um acúmulo de matéria seca de 35% e 26% respectivamente, em comparação com as plantas não inoculadas (controle). Os autores também observaram que as plantas inoculadas com a mistura das cinco estirpes apresentaram menores taxas de <sup>15</sup>N que o controle, indicando que a FBN contribuiu com cerca de 29% do N total nas plantas inoculadas. Posteriormente, o mesmo autor avaliou o efeito de dois inoculantes contendo bactérias endofíticas na produção de duas variedades de cana (SP70-1143 e SP81-3250) em diferentes tipos de solo (OLIVEIRA et al., 2006). Os inoculantes escolhidos foram baseados na boa resposta das pesquisas anteriores, sendo selecionada uma mistura de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia tropica* e uma mistura de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Os resultados demonstraram que a produção das plantas e a contribuição da FBN devido à inoculação foram influenciadas tanto pela escolha do inoculante quanto pela variedade da planta e tipo de solo (OLIVEIRA et al., 2006).

## 2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Em 1988, Cavalcante e Döbereiner identificaram uma nova bactéria denominada então *Saccharobacter nitrocaptans*. Essa bactéria foi descrita como microaeróbica, gram-negativa e fixadora de nitrogênio, tendo sido isolada de raízes e colmos de plantas de cana-de-açúcar no Brasil (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Além disso, foi observada a capacidade de crescer em soluções ácidas e de formar ácido acético a partir do etanol. Um ano mais tarde, Gillis et al. (1989) reclassificaram como *Acetobacter diazotrophicus*, baseados em estudos fisiológicos e moleculares. Com base em análises de sequências do RNAr 16S, a bactéria *Acetobacter diazotrophicus* foi renomeada para *Gluconacetobacter diazotrophicus* (YAMADA et al., 1998). Por meio dessas análises, mais duas bactérias foram adicionadas ao gênero as espécies *G. johannae* e *G. azotocaptans* (FUENTEZ-RAMIREZ et al., 2001).

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* pertence à família *Acetobacteraceae* e filo Proteobacteria. É uma bactéria Gram-negativa, com pH ótimo de crescimento na faixa de 4,5-5,8 e com células variando entre 0,5 a 0,9 μm e não apresenta movimento espiralado. Essa bactéria pode ser isolada em meio semissólido LGI-P (REIS, 1994) e, após o período de sete a dez dias, apresenta uma película alaranjada. Abaixo da película, o meio fica incolor devido à acumulação do azul de bromotimol (DÖBEREINER et al., 1995).

*G. diazotrophicus* é considerada um diazotrófico aerotolerante, no qual o oxigênio é fundamental para a geração de grandes quantidades de ATP requerida para a fixação de nitrogênio. Dentre as propriedades fisiológicas, destacam-se a tolerância a altas concentrações de sacarose; acidificação do meio e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme demonstrado por Cojho et al. (1993). A infecção e colonização da cana-de-açúcar pela *G. diazotrophicus* foi demonstrada

por meio de microscopia eletrônica e ótica (JAMES et al., 1994). Na superfície da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção de raízes laterais (JAMES et al., 1994). Na raiz, pode ser vista no interior de células epidérmicas e nos espaços intercelulares do parênquima, bem como em vasos do xilema, através dos quais a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (DONG et al., 1994).

Além da cana-de-açúcar, muitos autores já observaram a presença dessa bactéria em outras culturas como batata-doce (*Ipomoea batatas*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), abacaxi (*Ananas comosus*) e café (*Coffea arabica*) (DÖBEREINER et al., 1988; PAULA et al., 1991; JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2000). Além disso, *G. diazotrophicus* já foi isolada nos esporos de fungos micorrízicos arbusculares e de insetos que infectam a cana-de-açúcar (SARAVANAN et al., 2007).

A interação de *G. diazotrophicus* com plantas de cana-de-açúcar tem sido bastante estudada devido aos benefícios que essa interação pode trazer para o aumento da produtividade da planta. Além da capacidade de fixação de nitrogênio, diversos estudos têm demonstrado que essa bactéria endofítica também produz hormônios vegetais, como ácido indol acético e giberilinas (BASTIÁN et al., 1998; LEE et al., 2004; RODRIGUES, 2008; BERTALAN et al., 2009) e sideróforos (LOGESHWARAN et al., 2009); solubiliza zinco (SARAVANAN et al., 2007) e produz substâncias antagonistas contra fitopatógenos (PIÑÓN et al., 2002; BLANCO et al., 2005; SARAVANAN et al., 2007).

### 3. Controle Biológico

Os primeiros estudos com controle biológico foram realizados por Sanford na década de 20. Seus estudos abordavam fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies*, causador da sarna da batatinha (BELLOW e FISHER, 1999). Somente em 1931, o termo “controle biológico” foi utilizado, num artigo sobre mal do pé do trigo (BELLOW e FISHER, 1999). Desde sua primeira utilização, vários conceitos foram utilizados para defini-lo. Cook e Baker (1983) definiram o conceito de controle biológico como “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”. Com base nas várias definições, o conceito de controle biológico tornou-se amplo, podendo incluir práticas culturais para a obtenção de ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos, bem como o melhoramento da planta para resistência ao patógeno em potencial ou a adequação do hospedeiro às atividades antagonistas de microrganismos.

No Brasil, o primeiro relato de controle biológico foi feito em 1924, no aparecimento da broca do café nas lavouras paulistas, sendo utilizadas no combate à vespinha de Uganda (INSTITUTO BIOLÓGICO, 2009) O controle biológico começou a ser utilizado no Brasil no combate ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e ao Baculovírus, no controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata* e *M. posticata*) e da lagarta *Anticarsia gemmatilis* na soja, respectivamente (ALVES, 1998; ATHAYDE, 2002). Nesse último, o inóculo com *Baculovirus anticarsia* foi utilizado em mais de dez milhões de hectares, proporcionando ao país uma economia estimada em cem milhões de dólares em defensores agrícolas, sem considerar os benefícios ambientais resultantes da não aplicação de mais de onze milhões de litros de agrotóxicos (QUIRINO, 2003). Para se compreender o aumento dos efeitos benéficos desses microrganismos para a planta, permitindo a sua utilização na agricultura, deve-se inicialmente conhecer as espécies microbianas envolvidas e as estratégias utilizadas pelos microrganismos nessa interação, para posteriormente se poder cultivar o (s) microrganismo (s) e reinoculá-lo (s) nas plantas de interesse. Dentre os agentes de controle microbiano de insetos que estão sendo utilizados no país, destacam-se os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Sporothrix insectorum*, os agentes de natureza viral *Baculovirus anticarsia*, *Baculovirus erinnyis* e *Baculovirus spodoptera* e os produtos à base das bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*

(QUIRINO, 2003). Estudos pioneiros nos anos 80 verificaram que a presença de fungos endofíticos poderia reduzir o ataque de insetos à planta hospedeira, sendo detectadas, a partir desse período, inúmeras espécies com potencial para o controle biológico de pragas. Posteriormente, verificou-se que essa redução da herbivoria ocorre em virtude da produção de compostos que reduzem a atratividade da planta, aumentam a susceptibilidade do inseto a doenças ou inibem o seu desenvolvimento (PEIXOTO NETO et al., 2002). Esses estudos foram realizados principalmente em gramíneas dos gêneros *Lolium* e *Festuca* em associação com o fungo *Neotyphodium*, o qual diminui a incidência de insetos como afídios, coleópteros, hemípteros e lepidópteros (AZEVEDO et al., 2000). Na cultura do cacau, o fungo *Trichoderma* tem sido utilizado em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa, mostrando ser esta uma importante estratégia para a redução da utilização de compostos químicos (PEIXOTO NETO et al., 2002). Contudo, embora o controle biológico traga respostas positivas à redução do uso de defensores agrícolas e à melhora de renda dos agricultores, analisando o conjunto de experiências mundialmente, verifica-se que os resultados ainda estão concentrados em apenas alguns cultivos e, principalmente, no controle de insetos. Em outras palavras, ainda existe muito a desenvolver nas áreas de controle de doenças (QUIRINO, 2003).

Os primeiros trabalhos envolvendo a introdução de antagonistas visando ao controle biológico de doenças nas plantas foram realizados já no século XX. Hartley (1921), citado por Romeiro (2005), inoculou, em solos de viveiros de mudas de essências florestais, fungos como potenciais antagonistas para o controle de tombamento. Esse mesmo autor cita que Millard e Taylor (1927) reduziram a severidade de sarna (*Streptomyces scabies*) pelo uso do antagonista *Streptomyces precox*. Já em 1940, os estudos de controle biológico concentraram-se no poder antagonista de certos fungos e em estudos de solos supressivos (BAKER e COOK, 1974; ROMEIRO, 2005). Na década de 70, muitos estudos enfatizaram o poder de bactérias promotoras de crescimento (PGPR) no controle biológico. Atualmente, a utilização de substâncias microbianas antagonistas para o controle de fitopatógenos é bastante estudada, sendo uma das áreas de estudo da fitopatologia.

O controle biológico por organismos antagonistas pode ocorrer por diferentes formas, sendo as principais: antibiose, competição, parasitismo, interferência nos mecanismos de virulência do patógeno e indução de resistência na planta (STRANGE, 2003). Em relação à antibiose, os microrganismos antagonistas possuem a capacidade de sintetizar muitos compostos antimicrobianos. Entre eles, estão antibióticos (fenazinas, acetilfloroglucinol, oomicina, antranilatos), bacteriocinas, sideróforos e outros compostos voláteis.

### 3.1 Bacteriocinas

Já em 1953, o termo bacteriocina era definido como substância de natureza proteica, produzida por um microrganismo que causa um efeito de consequência letal em outro microrganismo (JACOB, et al., 1953). A síntese de substâncias antimicrobianas é um fenômeno que já foi bem descrito em diversas bactérias. Os compostos antimicrobianos incluem toxinas, enzimas líticas, produtos de vias metabólicas, antibióticos e bacteriocinas (RILEY, 1998). As bacteriocinas são compostos produzidos por bactérias que inibem ou matam outras bactérias, sendo estas, na maioria das vezes, filogeneticamente relacionadas com as produtoras (JAMES et al., 1996). Apesar de haver grande diversidade de bacteriocinas, a maioria delas apresenta características em comum. Elas geralmente apresentam alta massa molecular e uma ação antimicrobiana que interfere na parede celular do organismo alvo de diversas formas, podendo inibir a biossíntese da parede celular ou ocasionar a formação nela de poros, resultando assim na morte celular (JACK et al., 1995). Diferentemente de outros compostos antibacterianos produzidos por bactérias, as bacteriocinas se caracterizam por sua ação letal primária, sua inativação por tripsina e resistência a pH 2 (KLAENHAMMER, 1988).

Os primeiros estudos com bacteriocinas aconteceram em 1925, quando os pesquisadores Gratia e Fredericq descreveram um antagonismo entre estirpes de *Escherichia coli* (RILEY e CHAVAN, 2007). A primeira observação de uma bacteriocina em bactérias gram-positivas foi documentada em 1947 por Mattick e Hirsch. Esses pesquisadores descobriram uma atividade antagonista de algumas bactérias lácticas quando inoculadas com outras estirpes. A molécula inibitória foi caracterizada como uma proteína denominada nisina (MATTICK e HIRSCH, 1947; RILEY e CHAVAN, 2007). Em 1976, foi editada a primeira revisão de literatura sobre bacteriocinas de bactérias gram-positivas. Nessa revisão, Tagg et al. (1976) já previram o crescente interesse e o potencial das bacteriocinas em diversas aplicações como em conservação de alimentos, produção de novos peptídeos antimicrobianos e controle biológico. Duas décadas mais tarde, a literatura científica no campo da bacteriocina começou a aumentar devido aos crescentes estudos das bacteriocinas em bactérias lácticas (JACK et al., 1995).

### 3.1.1 Classificação

#### 3.1.1.1 Ocorrência de bacteriocinas em bactérias gram-positivas

As bacteriocinas produzidas pelas bactérias gram-positivas são geralmente catiônicas, anfífilas e de tamanho variável de 2 a 6 kDa (VAN KRAAIJ et al., 1999). As bactérias gram-positivas mais conhecidas como produtoras de bacteriocinas são as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) que atuam na conservação de carnes e produtos lácteos. Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas estão distribuídas em quatro diferentes classes. Em geral, na classe I, encontram-se os lantibióticos, que são pequenos peptídeos (19 a 38 resíduos de aminoácidos), termoestáveis de baixa massa molecular (< 5 kDa) e que apresentam, em sua composição, aminoácidos de lantionina e β-metil-lantionina (GUDER et al., 2000). O principal representante dessa classe é a nisina, produzida pelas bactérias *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. Os lantibióticos são divididos em dois subgrupos A e B cuja diferença é baseada nas características estruturais e no modo de ação da toxina (JUNG e SAHL, 1991). O subgrupo A de lantibióticos matam as células alvo por meio da despolarização da membrana plasmática (BELKUM et al., 1989). Os lantibióticos do subgrupo B são menores, possuem uma estrutura secundária mais globular e matam as células alvos por meio de inibição enzimática como, por exemplo, a inibição da síntese da parede celular (BROTZ et al., 1995).

A classe II caracteriza-se por apresentar bacteriocinas com tamanho de 30 a 60 aminoácidos, termoestáveis, de massa molecular menor que 10 kDa e que não contêm a lantionina como aminoácido. Essa classe é dividida em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B). As bacteriocinas da classe III caracterizam-se por apresentar peptídeos termolábeis extremamente sensíveis ao calor e de alta massa molecular (> 30 kDa). Já na classe IV, encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura (RILEY, 1998).

#### 3.1.1.2 Ocorrência de bacteriocinas em bactérias gram-negativas

Geralmente as bacteriocinas das bactérias gram-negativas são maiores que as das gram-positivas. Porém, seu tamanho varia de cerca de 10 kDa a 20 kDa. Dentre as bacteriocinas mais conhecidas, estão a colicina, a microcina e a piocina. Das bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-negativas, as colicinas da bactéria *Escherichia coli* são as mais estudadas (LAZDUNSKI, 1988). Elas possuem alta massa molecular (acima de 20 kDa) e seus genes se localizam geralmente em plasmídeos. As colicinas têm por característica inibir o crescimento de bactérias que são estreitamente relacionadas filogeneticamente com a *E. coli* e o gênero *Salmonella* (BRAUN et al., 1994). As colicinas têm sido amplamente estudadas e são utilizadas como modelo no estudo dos mecanismos de síntese, ação e regulação das bacteriocinas (BRAUN et al., 1994). As microcinas se

caracterizam por serem termoestáveis, resistentes a certas proteinases, hidrofóbicas, resistentes em pH baixo e por possuir baixa massa molecular (menos que 10 kDa). É sintetizada principalmente por bactérias do gênero *Enterobacteriaceae* (GILLOR et al., 2005). Outro grande grupo de bacteriocinas produzidas por bactérias gram-negativas é o da piocina. O gênero *Pseudomonas* representa seu maior produtor, sendo que até 90% das estirpes da espécie *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza pelo menos uma piocina. Uma característica que difere as piocinas das colicinas é a de os genes que sintetizam as piocinas serem encontrados exclusivamente em cromossomos, e não em plasmídeos (RILEY e GORDON, 1992).

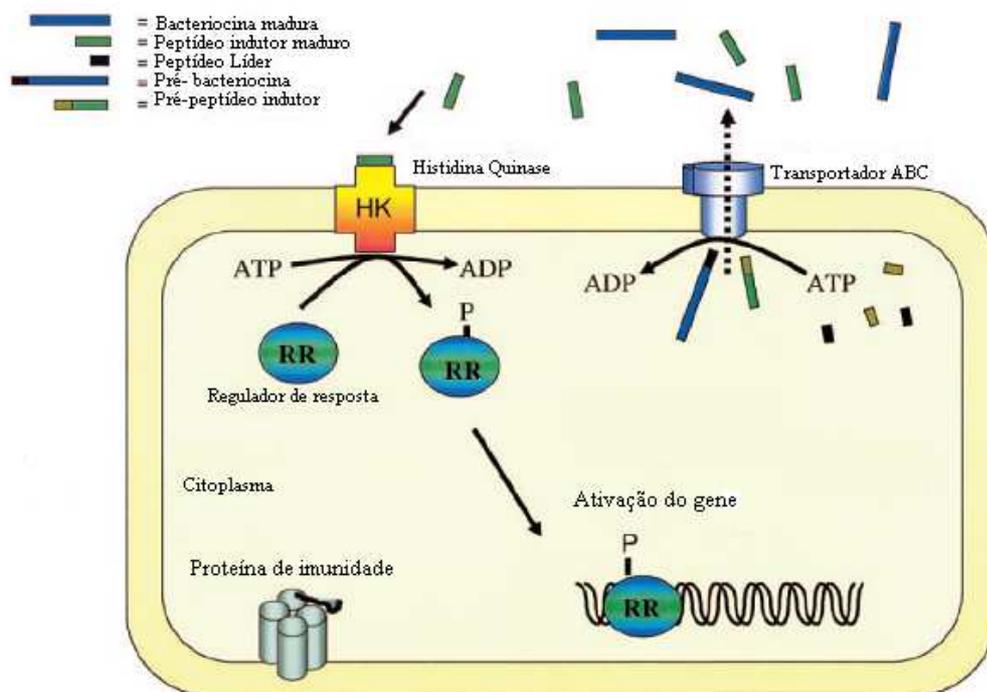
### 3.1.2 Síntese e regulação

#### 3.1.2.1 Síntese de bacteriocinas em bactérias gram-positivas

Os aspectos bioquímicos e genéticos envolvidos na biossíntese de bacteriocinas das classes I e II têm sido extensivamente investigados, em razão de sua conhecida atividade letal contra patógenos alimentares (ABEE et al., 1995). A síntese de bacteriocina geralmente envolve quatro genes distintos, que geralmente se localizam em um só operon. O primeiro é o responsável pela síntese de um pré-peptídeo ou pré-bacteriocina. O segundo gene é responsável pela síntese de uma proteína que confere imunidade à bacteriocina por ela produzida. Essa proteína de imunidade apresenta geralmente 51 a 150 aminoácidos que geralmente não apresentam homologia significativa entre si, enquanto as bacteriocinas apresentam 38 a 55% de similaridade (ABEE et al., 1995; AYMERICH et al., 1996). O terceiro codifica proteínas do transporte ABC que exportam a bacteriocina e, por fim, o quarto gene ainda tem uma função pouco conhecida, mas se sabe que ele codifica uma proteína acessória que, embora não pertença ao transporte ABC, se faz necessária para a exportação (NES et al., 1996).

As bacteriocinas são sintetizadas, primeiramente, na forma de pré-peptídios ou pré-bacteriocinas biologicamente inativos. Esses pré-peptídios contêm uma sequência guia N-terminal de 18 a 27 aminoácidos, apresentando duas glicinas. Esse precursor é transportado à superfície celular durante a fase de crescimento exponencial e catalisado na forma ativa. O transportador contém uma porção proteolítica N-terminal, responsável pela clivagem do peptídeo guia, além de uma porção C-terminal responsável pela hidrólise do ATP e fornecimento de energia (AUCHER et al., 2005). A função da sequência guia na pré-bacteriocina é evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora e servir como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte que envolve as proteínas do transporte ABC e a proteína acessório (NES et al., 1996). Segundo Moll et al. (1999), as duas glicinas presentes na sequência de aminoácidos são as responsáveis pelo reconhecimento da pré-bacteriocina no sistema de transporte. Após o reconhecimento do pré-peptídeo, essas duas glicinas são removidas, e a bacteriocina, excretada da célula (ENNAHAR et al., 2000).

O sistema responsável pela regulação da produção de bacteriocinas é composto por três componentes: um peptídeo indutor (ferormônio ou fator de ativação), uma histidina quinase transmembrana (proteína receptora do fator de ativação) e uma proteína reguladora de resposta (NES; EIJSINK, 1999). O peptídeo indutor é produzido no ribossomo como pré-peptídeo, que é clivado e secretado no meio externo pelo transportador. Quando este atinge uma certa concentração no meio extracelular, a histidina quinase transmembranar é ativada fosforilando, assim, a proteína reguladora de resposta. A proteína reguladora, uma vez fosforilada, ativa a transcrição da bacteriocina, iniciando assim um *feedback* positivo (NES; EIJSINK, 1999) (Figura 4).



**Figura 4:** Representação esquemática da biossíntese de bacteriocina da classe II (adaptado de DRIDER et al., 2006).

### 3.1.2.2 Síntese de bacteriocinas em bactérias gram-negativas

A maioria dos artigos que abordam a síntese de bacteriocinas em bactérias gram-negativas faz referência à produção das colicinas. Os genes que codificam as colicinas são encontrados em plasmídeos de *E. coli*. Esses plasmídeos, denominados pCol, podem variar muito de tamanho, sendo encontrados plasmídeos de 6,6 kb até 94 kb (SMADA; SMAJS, 1998). Nesses plasmídeos, são encontrados os genes estruturais [o que codifica a colicina propriamente dita (*col* ou *cea*)], o que codifica uma proteína de imunidade e o que codifica uma proteína de transporte para a liberação da colicina no meio. O gene para a colicina e o de sua liberação geralmente constituem um único operon. Em condições normais, a transcrição do operon é reprimido pela ligação da proteína repressora LexA.

A produção da colicina é induzida pela presença de agentes que danificam o DNA ou por fatores ambientais como o aumento da densidade populacional ou falta de nutrientes. Quando as bactérias produtoras são expostas à irradiação UV, a colicina é produzida em grande escala (JAMES et al., 1996). O fator responsável por essa indução é o “sistema SOS de reparo do DNA”, que causa a ativação da proteinase RecA, que, por sua vez, inativa a proteína LexA, desbloqueando a síntese da colicina (SPANGLER et al., 1985). Quando o sistema SOS é induzido, a colicina se acumula dentro da célula e sua exportação só se inicia quando ela se encontra em uma grande concentração no citoplasma bacteriano. Pela ação da proteína de transporte, a membrana externa começa a ficar permeável permitindo, assim, a liberação de proteínas de baixa massa molecular, o que inclui as colicinas. Em algumas bactérias, o aumento na permeabilidade da membrana externa acarreta a lise parcial das células, ocasionando a morte das células produtoras. Dessa forma, a produção de colicina é conhecida como um fenômeno “suicida” (ALONSO et al., 2000).

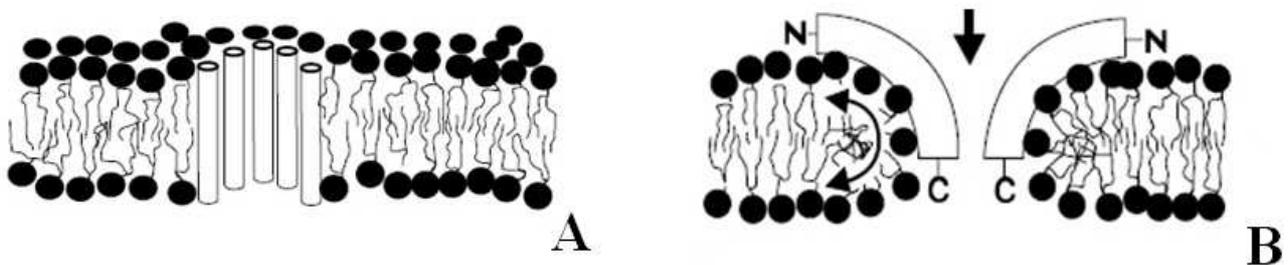
### 3.1.3 Mecanismos de ação

#### 3.1.3.1 Mecanismo de ação de bacteriocinas em bactérias gram-positivas

Estudos revelam que muitas das bacteriocinas produzidas pelas bactérias gram-positivas, como os lantibióticos, atuam no plano da membrana plasmática (MONTVILLE; CHEN, 1998). Essas bacteriocinas permeabilizam a membrana plasmática por meio da formação de poros,

ocasionando assim desbalanço iônico e do fluxo de íons fosfato. Com isso, há dissipação da força protômica (PMF), que está envolvida diretamente com a síntese de ATP, fosforilação das proteínas, síntese e rotação dos flagelos e transporte de proteínas (ROSA; FRANCO, 2002). Com a dissipação da força protômica, 98,9% de ATP é hidrolisado. O transporte ativo de aminoácidos cessa e os aminoácidos de reserva são liberados da célula pelos poros formados. Esse distúrbio primário talvez gere outras desordens como lise celular (GARCERÁ et al., 1993). A formação dos poros pela bacteriocina se dá pelas interações eletrostáticas da carga positiva e dos resíduos polares da bacteriocina com os fosfolipídios aniônicos presentes na membrana plasmática das células alvo (ABEE et al., 1995). Estudos mostram que, no caso dos lantibióticos, estes não necessitam de receptores membranares (SAHL et al., 1987). Breukink et al. (1999) demonstraram que certos lipídios presentes na membrana plasmática da bactéria susceptível podem servir como receptores aumentando a condutividade e estabilidade de poros produzidos pelos lantibióticos.

Em relação à formação dos poros, as bacteriocinas podem atuar de duas formas distintas. Elas diferem quanto à forma de inserção da bacteriocina na membrana da célula alvo. No modelo *Barrel-stave*, a bacteriocina se liga como monômero à membrana citoplasmática, inserindo-se na bicamada lipídica e se agregando lateralmente para a formação do poro (ROSA; FRANCO, 2002). Estudos utilizando sondas fluorescentes mostram que a molécula da nisina penetra na porção hidrofóbica da membrana citoplasmática (MARTIN et al., 1996). No modelo *Wedge-like*, a formação do poro se dá pela atuação local da bicamada lipídica. Quando a bacteriocina se liga à membrana plasmática, esta apenas entra em contato com a parte hidrofílica e não com a parte hidrofóbica (Figura 5).



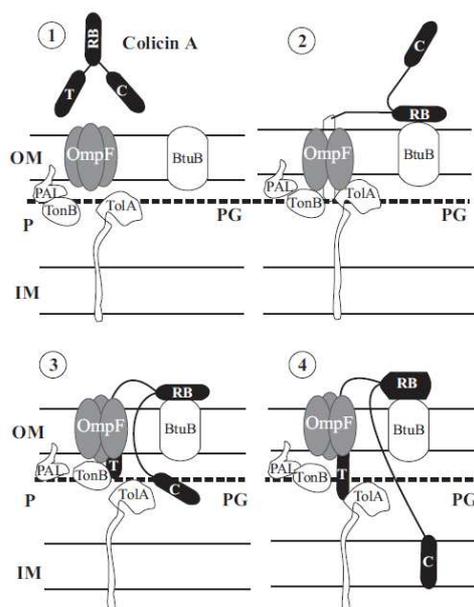
**Figura 5:** Formação de poros membranares ocasionados por bacteriocinas. A letra A representa o modelo *Barrel-stave* e a B, o modelo *Wedge-like* (ROSA; FRANCO, 2002).

Segundo Ruhr e Sahl (1985), os lantibióticos são mais efetivos contra bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas, uma vez que a membrana externa pode se constituir em uma barreira física que dificulta a ligação das bacteriocinas na membrana plasmática.

### 3.1.3.2 Mecanismo de ação de bacteriocinas em bactérias gram-negativas

As colicinas possuem a capacidade de ocasionar a morte celular de bactérias sensíveis por três diferentes formas. A principal delas, como acontece nas bactérias gram-positivas, é a formação de poros na membrana plasmática, resultando na despolarização membranares (SMADA e SMAJS, 1998). Esse mecanismo é melhor entendido quando se observa a Figura 6. Na figura, observa-se que a colicina, neste caso a colicina A, possui três domínios distintos. Um domínio responsável pela ligação com receptores das células alvo (RB), um domínio responsável pela translocação da proteína (T) e um domínio responsável pela ação da colicina propriamente dita (C). Primeiramente, a colicina se liga a um receptor específico na membrana externa da célula alvo (BtuB). Após o reconhecimento e ligação com esse receptor, a colicina é então desdobrada, permitindo a translocação do domínio T para dentro de uma proteína porina (OmpF). Dentro da membrana externa, o domínio T reage com a proteína TonB. A proteína TonB ligada ao domínio T não pode

mais interagir com a proteína de membrana PAL. Quando essa ligação não ocorre, há uma desestabilização local dos peptidoglicanos que permite que o domínio C entre na membrana interna e forme o poro. Com a formação dos poros, o gradiente eletroquímico transmembranar é interrompido e ocorre um efluxo de fosfato e potássio para fora da célula, o que diminui os níveis de ATP citoplasmáticos (LAZDUNSKI et al., 2000). Outra forma, porém bem menos frequente, é a atuação da colicina como nuclease, podendo atuar diretamente contra o DNA cromossomal da célula alvo agindo como uma endonuclease. A colicina também pode atuar degradando a parede celular e inibindo a síntese de peptidoglicanos e mureína (SMADA e SMAJS, 1998).



**Figura 6:** Modo de ação da colicina A. OM = membrana externa, IM = membrana interna, PG = peptidoglicanos, P = espaço periplasmático. 1: Colicina com seus três domínios, 2: Domínio RB se liga ao receptor (BtuB) e se desdobra. O domínio C entra na porina OmpF. 3: O domínio T interage com a proteína TolB que não pode mais interagir com a proteína PAL. 4: O domínio C penetra na membrana interna formando o poro. (CURSINO et al., 2002).

### 3.1.4. Utilização de bacteriocinas no controle biológico

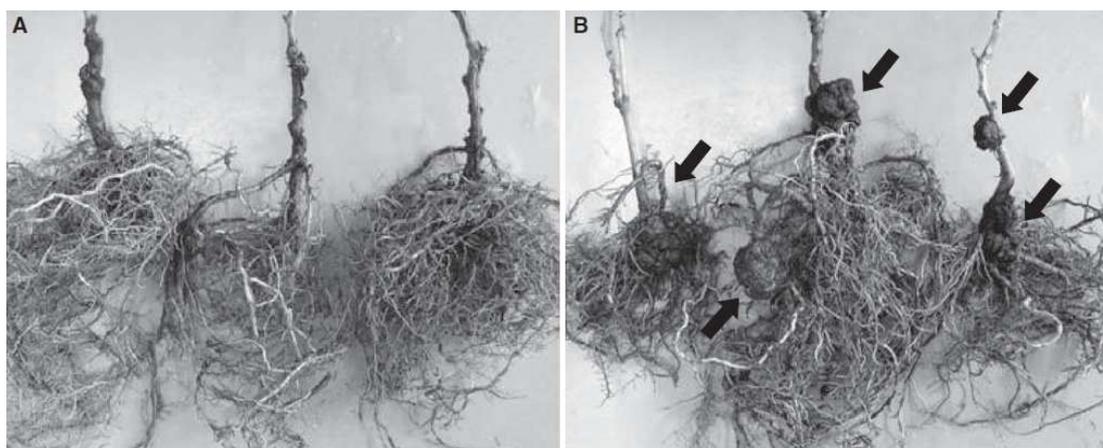
O estudo mais conhecido de controle biológico pela utilização de uma bacteriocina foi o do pesquisador Allen Kerr, em 1980 (KERR, 1980). Kerr obteve isolados de *Rhizobium radiobacter* do solo e observou que possuíam grande capacidade antagonista contra *R. tumefaciens*, agente causal de galhas em plantas. Esse antagonismo se dá pela produção de uma bacteriocina, denominada agrocina 84, nos isolados de *R. radiobacter*. Os genes responsáveis pela síntese da agrocina 84 localizam-se no plasmídeo pAgK84 na espécie *R. radiobacter*. Já a sensibilidade à agrocina é determinada pelo plasmídeo Ti em *R. tumefaciens*. Estudos de Cooksey e Moore (1982) demonstraram que mutantes de *R. radiobacter* para os genes que codificam a síntese de agrocina 84 não foram capazes de prevenir o aparecimento de galhas quando coinoculadas com o patógeno.

Atualmente, várias bacteriocinas vêm demonstrando resultados promissores no controle biológico de fitopatógenos. Já em 1984, Chen e Echandi, estudando a murcha bacteriana em tabaco, observaram a ausência de sintomas quando o patógeno *Ralstonia solanacearum* era coinoculado com outra estirpe da mesma bactéria, só que avirulenta e produtora de bacteriocina. A atividade da bacteriocina foi então confirmada, uma vez que a coinoculação de estirpes avirulentas e não produtoras de bacteriocina com o patógeno não provocou os sintomas da murcha. Estirpes avirulentas e produtoras de bacteriocina de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* também reduziram os sintomas do crestamento bacteriano em folhas de arroz (SAKTHIVEL; MEW, 1991).

Estudos de Kyeremeh et al. (2000) demonstraram que dois mutantes avirulentos e produtores de bacteriocinas de *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* (A-f-39 e B-e-19) inibiram estirpes patogênicas dessa mesma bactéria. Essa atividade antagonista foi acompanhada em campo por um período de dois anos e comparada a um agente químico de controle microbiano. A proteção obtida pelo mutante A-f-39 foi maior do que a ocasionada pelo agroquímico.

Foi observada na bactéria *Serratia plymthicum* a produção de uma bacteriocina que inibe a multiplicação (tanto *in vitro* quanto *in vivo*) da bactéria *Erwinia amylovora*, agente causal da queima bacteriana em culturas de maçãs e peras. Essa bacteriocina (serracina P), além de provocar antagonismo contra espécies relacionadas, também demonstrou antagonismo contra 24 estirpes de *E. amylovora* oriundas de diferentes países (JABRANE et al., 2002). As bacteriocinas produzidas pelas espécies do gênero *Pseudomonas* também são largamente utilizadas no controle biológico de fitopatógenos. A bacteriocina produzida pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* inibe o crescimento de *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*, agente causal da galha em oliveiras, tanto *in vitro* quanto em experimentos de campo. A presença da bacteriocina também afetou a sobrevivência epifítica do patógeno nas folhas e ramos das plantas tratadas (LAVERMICOCCA et al., 2002).

Observe-se nos estudos de Kawaguchi et al. (2007) a capacidade do gênero *Rhizobium* em produzir bacteriocina. Uma estirpe não patogênica de *R. vitis* (VAR03-1) foi testada como agente de controle biológico contra outra estirpe patogênica, agente causal da galha-da-coroa em videira. A estirpe não patogênica inibiu a formação da galha tanto em plantas de tomate como em videiras (Figura 7).



**Figura 7:** Controle biológico do agente etiológico da galha-da-coroa da videira pela estirpe não patogênica (VAR03-1) de *Rhizobium vitis*. A: As plantas de videira foram plantadas após a inoculação da estirpe não patogênica seguida da inoculação da patogênica. B: As plantas de videira foram plantadas após a inoculação da estirpe patogênica de *R. vitis* (controle positivo). (Kawaguchi et al., 2007.)

Alguns trabalhos já demonstraram antagonismo contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Piñón et al. (2002) observaram que a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* secreta uma bacteriocina em meio de cultura que inibe o crescimento da bactéria *X. albilineans*, agente causal da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar. Essa inibição se deu pela ruptura das células bacterianas. Já Bonini et al. (2007) testaram *in vitro* o antagonismo contra *X. axonopodis* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico. Vinte e cinco isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* e 14 isolados de outras espécies do mesmo gênero foram comparados a fim de se verificar a capacidade de produção de bacteriocina e sensibilidade. Isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por todos os isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* avaliados. Dos 25 isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*, apenas cinco não foram inibidos pelas bacteriocinas produzidas por dois isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

### 3.2 Utilização de Bactérias Endofíticas no Controle Biológico de Fitopatógenos

Bactérias endofíticas estão presentes em todas as espécies vegetais, permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, as bactérias endofíticas apresentam grande potencial para o controle biológico (HALLMANN et al., 1997). Esse controle pode ser resultante de diversos mecanismos como: competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira; produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN et al., 1997) e indução de resistência sistêmica (M'PIGA et al., 1997; DUIJFF et al., 1998; BENHAMOU et al., 2000).

Estudos têm mostrado que pelo menos 15 gêneros de bactérias são capazes de controlar doenças fúngicas ou bacterianas; destes, *Bacillus* e *Pseudomonas* têm mostrado um maior potencial para o controle efetivo de doenças (PEIXOTO NETO et al., 2002). A cultura do repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) tem recebido especial atenção e resultados importantes foram obtidos no controle de *X. campestris* pelas bactérias endofíticas *Alcaligenes piechaudii* e *Kluyvera ascorbata* (ASSIS et al., 1998). Em batata (*Solanum tuberosum*) e trevo vermelho (*Trifolium pratense*), foram isoladas 25 espécies de bactérias endofíticas, de 18 gêneros, das quais 74% apresentaram *in vitro* antibiose ao fungo *Rhizoctonia solani* (STURZ et al., 1998). Em arroz, foram isoladas bactérias endofíticas que apresentaram alta atividade antimicrobiana contra *R. solani*, *Pythium myriotylum*, *Guamannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum* (MUKHOPADHYAY et al., 1996). Reiter et al. (2002) observaram que a inoculação do patógeno *Pectobacterium atrosepticum* promoveu um aumento da diversidade de microrganismos endofíticos pertencentes a uma grande diversidade de grupos bacterianos, estando muito deles envolvidos na defesa da planta contra a ação daquele patógeno.

Além de sua capacidade de fixar nitrogênio, muitos autores perceberam a capacidade dessas bactérias em sintetizar compostos antimicrobianos. Hu e Young (1998) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de diversas bactérias, entre elas *Burkholderia* spp. e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A metodologia utilizada foi a antibiose por dupla camada invertida por Kékessy e Piguet (1970). Os autores observaram que todas as espécies de *Burkholderia* testadas inibiram o crescimento do fungo *Rhodotorula mucilaginosa*. O mesmo efeito foi observado em oito estirpes das 11 testadas de *H. rubrisubalbicans*. Além disso, foi observado o efeito inibitório de *H. rubrisubalbicans* contra *Clavibacter michiganensis*. Weber et al. (2007) também observaram antagonismo de espécies de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* contra o fungo *Fusarium oxysporum* em experimentos de casa de vegetação com banana-maçã. Já bactérias do gênero *Burkholderia* isoladas de cana-de-açúcar foram capazes de inibir o crescimento de *Fusarium* spp. e *Sporisorium scitamineum*, agentes causais da podridão de fusarium e da doença do carvão, respectivamente (VAN ANTWERPEN et al., 2002). O controle biológico de nematoides por bactérias diazotróficas endofíticas também já foi verificado por Guyon et al. (2003). Os autores observaram que das 77 estirpes testadas de *Burkholderia tropica*, 19 provocaram paralisia nas ninfas de *Meloidogyne*. Já para *G. diazotrophicus*, alguns experimentos demonstraram que essa bactéria acarreta efeito inibitório contra o nematoide *Meloidogyne incognita* (BANSAL et al., 2005), ao fungo *Colletotrichum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY, 2000) e contra a bactéria *Xanthomonas albilineans* (ARENCIBIA et al., 2006; PIÑON et al., 2002; BLANCO et al., 2005; MUÑOS-ROJAS et al., 2005). Diante do exposto, o controle biológico por bactérias diazotróficas endofíticas é uma linha de pesquisa com um grande potencial, pois, além da contribuição nitrogenada, estas bactérias podem contribuir para uma melhor fitossanidade diminuindo, além da adubação nitrogenada, a adição de pesticidas e fungicidas.

## CAPÍTULO I

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA ESTIRPE PAL5<sup>T</sup> DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* CONTRA AS ESTIRPES DO INOCULANTE DE CANA-DE-AÇÚCAR E A BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas albilineans***

## RESUMO

A produção de um inoculante para cana-de-açúcar contendo bactérias diazotróficas, além de aumentar a produtividade dessa cultura, acarreta menores danos ao ambiente. Além do ganho econômico derivado da FBN, microrganismos endofíticos têm sido utilizados no controle biológico de fitopatógenos. O controle pode ocorrer por competição de espaço e nutrientes e pela produção de bacteriocinas. O inoculante para cana-de-açúcar produzida pela Embrapa com bactérias diazotróficas (*Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*) requer estudos adicionais além dos relacionados com os ganhos na aquisição de nitrogênio, tais como a interação e competição entre as próprias estirpes do inoculante. A produção de compostos antagonísticos já foi observada em bactérias endofíticas como *G. diazotrophicus* e *B. tropica*. O estudo de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas é de extrema importância para o entendimento da interação das estirpes que compõem o inoculante. Além disso, é interessante entender o já descrito antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> contra a bactéria *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaldadura de folhas de cana-de-açúcar. Para analisar essas hipóteses, foi utilizada a metodologia de antibiose por dupla camada. A estirpe de PAL5<sup>T</sup> foi submetida a diferentes tempos de radiação ultravioleta para se avaliar a necessidade de indução para a síntese de substâncias antagonísticas. Da mesma forma, foi avaliada a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como possível indutor da síntese de compostos antimicrobianos em *G. diazotrophicus*. O antagonismo foi avaliado pela análise visual dos halos de inibição juntamente com a medição de seus diâmetros. Os resultados mostraram que não houve efeito antagonístico contra nenhuma das estirpes testadas quando a estirpe PAL5<sup>T</sup> não foi exposta à indução por UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, a exposição da estirpe PAL5<sup>T</sup> à UV inibiu parcialmente o crescimento de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Os resultados mostraram que a exposição da estirpe PAL5 pelo tempo de 20 minutos à UV foi o que promoveu maior antagonismo contra a bactéria *X. albilineans*. A substância antagonística produzida não foi capaz de manter sua atividade a 95°C. Na exposição da estirpe PAL5<sup>T</sup>, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM), promoveu um antagonismo da estirpe contra *X. albilineans* e *H. rubrisubalbicans*. Os resultados obtidos sugerem que existe um antagonismo contra a bactéria fitopatogênica e contra as duas espécies de *Herbaspirillum* testadas. Entretanto, a estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* só é capaz de inibir o crescimento dessas espécies quando exposta a agentes externos que acarretam a síntese dessas substâncias antimicrobianas.

**Palavras-chaves:** antagonismo, inoculante, cana-de-açúcar

## ABSTRACT

The sugarcane inoculant containing diazotrophic bacteria may increase the plant productivity and additionally decreases the environment damage. In addition to economic gain derived from BNF, endophytic microorganisms have been used in the biological control of phytopathogen because they can control plant pathogens through competition, space, nutrients and bacteriocin production. The introduction of sugarcane inoculant produced by Embrapa with diazotrophic bacteria (*Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Burkholderia tropica*) requires additional studies, besides the BNF, such as the interaction and competition among the inoculant strains. The production of antagonistic compounds was already observed in endophytic bacteria such as *G. diazotrophicus* and *B. tropica*. The study of antimicrobial substances like bacteriocins is extremely important for understanding the interaction of these strains in the inoculant. Furthermore, it is interesting to understand the possible antagonism role played by PAL5<sup>T</sup> strain against the *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald in sugarcane. To prove this hypothesis, the double agar layer method was utilized. The PAL5<sup>T</sup> strain was submitted to different ultraviolet radiation intervals to evaluate the induction of antagonistic substances. Similarly, it was evaluated the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a possible inducer of the antimicrobial compound synthesis. The antagonism was evaluated by nick eyes and measurement of the halo diameters. The results showed no antagonistic effect against the inoculant strains when the PAL5 strain was not exposed to UV. On the other hand, the induction of Pal5 strain to UV partially inhibited growth of *H. seropedicae* a *H. rubrisubalbicans*. In addition, the results showed that exposition of PAL5 to UV for 20 minutes promoted the highest antagonistic effect against *X. albilineans*. It was also observed that the antagonistic substance produced was not active when heated at 95°C. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) promoted an antagonistic effect of PAL5 strain against the *X. albilineans* e *H. rubrisubalbicans*. These results suggested that there is an antagonistic effect against the phytopathogenic bacteria and both *Herbaspirillum* species tested. However, the strain PAL5 is only able to inhibit growth of these species when exposed to inducers such as UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that promote the synthesis of antimicrobial substances.

**Keywords:** antagonism, inoculant, sugarcane

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura que contribui com cerca de 60% a 70% de todo o açúcar produzido mundialmente (INGELBRECHT et al., 1999) e com uma das maiores produções de biomassa entre as espécies cultivadas (MA et al., 2000). Além disso, é uma cultura que necessita de uma dose extremamente alta de nitrogênio advindo do solo. Para alcançar uma produtividade média de 100 Ton.ha<sup>-1</sup> de colmos, a planta deve acumular em sua parte aérea cerca de 180 a 250 kg.ha<sup>-1</sup> de N (XAVIER, 2002).

A fertilização química vem sendo cada vez mais utilizada, uma vez que o nitrogênio é um elemento essencial para o desenvolvimento da cultura, sendo exigido em grandes quantidades para possibilitar o crescimento normal dos vegetais. Entretanto, a cultura não responde ou responde muito pouco à adubação nitrogenada na cana-planta (ROSSETTO et al., 2010). De fato, considerando-se que as quantidades de N-fertilizante aplicadas não ultrapassam a média de 80 kg.ha<sup>-1</sup>, o restante desse N pode ser proveniente de outras fontes principais: do N do solo, o qual é naturalmente um fator limitante nos solos brasileiros, e do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) realizado por bactérias diazotróficas (URQUIAGA et al. 1992; COELHO et al., 2003). Segundo Boddey et al. (2001), o nitrogênio advindo da FBN pode contribuir com até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar.

A Fixação Biológica de Nitrogênio é um processo metabólico conhecido desde o século XIX, que ocorre exclusivamente nas bactérias diazotróficas fornecendo nitrogênio atmosférico para o metabolismo formador de proteínas de inúmeros organismos, incluindo gramíneas como a cana-de-açúcar (BALDANI; BALDANI, 2005). Os primeiros estudos de inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas se iniciaram na década de 70 com inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum*. Os resultados, embora inconsistentes, indicaram que cerca de 40% de N necessário para as plantas advinha da FBN (BODDEY et al., 2001).

Apesar das respostas à inoculação nem sempre serem positivas, produtos à base de bactérias diazotróficas já estão sendo comercializados em alguns mercados, como Argentina, México e alguns países da Europa. Segundo Baldani et al. (2009), as simulações feitas com base na área plantada e no consumo de fertilizantes nitrogenados aplicados em culturas como arroz, cana-de-açúcar e milho no Brasil, demonstram que a substituição de apenas 25% da demanda de N pela FBN e a adoção da técnica em pelo menos 50% da área plantada, poderiam gerar uma economia de cerca de 200 milhões de reais ao ano. Além disso, também se faz necessário destacar os ganhos ambientais, uma vez que a menor utilização de fertilizantes químicos acarreta uma maior redução de nitrato que se acumula e contamina principalmente rios, lagos e o lençol freático.

Após 25 anos de pesquisa, em 2008 foi lançado pela Embrapa Agrobiologia um inoculante à base de cinco bactérias diazotróficas das seguintes espécies: *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia tropica*. Este inoculante vem sendo apresentado como uma solução inovadora para a cultura da cana-de-açúcar e foi baseado nos estudos inicialmente desenvolvidos por Oliveira et al., (2002) e Oliveira et al., (2006). Os autores observaram que esse inoculante contribuiu com 29,2% do N via FBN.

Os benefícios trazidos pelo novo inoculante lançado pela Embrapa podem se estender muito além da FBN na cultura de cana-de-açúcar. As espécies *A. amazonense*, *G. diazotrophicus* e bactérias do gênero *Herbaspirillum*, por exemplo, são consideradas bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) capazes de produzir hormônios vegetais como a auxina (BASTIÁN et al., 1998; RODRIGUES et al., 2008). Outra característica que tem sido observada é o efeito antagônico que algumas bactérias componentes do inoculante podem apresentar contra microrganismos fitopatogênicos (MUTHUKUMARASAMY, 2000; PIÑON et al., 2002; GUYON et al., 2003; BANSAL et al., 2005; BLANCO et al., 2005; ARENCIBIA et al., 2006; WEBER et al., 2007).

Em 2000, foi publicado o primeiro trabalho demonstrando que *G. diazotrophicus* poderia agir no controle biológico de fitopatógenos de cana-de-açúcar. Muthukumarasamy (2000) observou que essa bactéria conseguiu inibir o crescimento de *Colletotrichum falcatum*, agente etiológico da podridão vermelha, em condições *in vitro*. Há relatos de atividade antagônica de *G. diazotrophicus* contra *Xanthomonas albilineans*. Piñon et al. (2002) detectou a secreção de uma provável proteína em cultura líquida que inibiu o crescimento dessa bactéria fitopatogênica. Antagonismo semelhante foi observado por Blanco et al. (2005), só que em tecidos de cana-de-açúcar em que ambas as bactérias foram inoculadas. A produção de um inoculante que, além de otimizar o aproveitamento da FBN, atue como controle biológico de fitopatógenos em cana-de-açúcar é uma alternativa bastante promissora para a agricultura como um todo, uma vez que reduz a quantidade de adubação nitrogenada e pode atuar na fitossanidade da planta. Mais estudos são necessários para desvendar os mecanismos e consolidar a eficácia da produção de substâncias antagônicas em *G. diazotrophicus*. O sequenciamento completo do genoma dessa bactéria associado a sua presença no inoculante de cana-de-açúcar abre novas oportunidades para avaliar o papel desempenhado por essa bactéria diazotrófica endofítica, principalmente no que se refere ao possível efeito antagônico do inoculante contra as bactérias e aos fitopatógenos da cana-de-açúcar.

## OBJETIVOS

Avaliar os efeitos potenciais da utilização da bactéria diazotrófica endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* na produção de substâncias antagônicas por meio de:

- i) otimização de um protocolo *in vitro* para detectar a produção de substâncias antagônicas em *G. diazotrophicus* contra *Xanthomonas albilineans*;
- ii) avaliação do antagonismo de *G. diazotrophicus* contra outras espécies de bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Teste de antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*

Para este ensaio, utilizou-se a estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, oriunda da coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, e a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*, obtida da coleção de bactérias fitopatogênicas do Instituto Biológico do Estado de São Paulo.

Uma colônia característica de cada estirpe, obtida de cultivo em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986), foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio líquido DYGS, permanecendo sob agitação constante de 200 rpm a 30°C. A estirpe de *G. diazotrophicus* foi incubada por 48 horas, enquanto a estirpe de *X. albilineans* foi cultivada por 24 horas. Para o teste de antagonismo, a bactéria *G. diazotrophicus* foi inoculada (100 µl) em três pontos equidistantes em placas contendo meio sólido DYGS e incubada por 24 horas a 30°C.

#### 1.1 Avaliação da indução de substâncias antagônicas

##### 1.1.1 Método de adição de clorofórmio

As placas contendo as culturas de *G. diazotrophicus* crescidas em meio sólido foram invertidas e foi adicionado 1 ml de clorofórmio na parte interna da tampa da placa a fim de matar as células formadoras das colônias. Foi aguardado o tempo de 1 hora para que o vapor do clorofórmio fumigasse as culturas. O clorofórmio residual foi evaporado pela abertura das placas por 1 hora dentro da capela de fluxo laminar.

##### 1.1.2 Método de exposição à radiação ultravioleta

As colônias de *G. diazotrophicus* (estirpe PAL5) foram expostas por 20 minutos à radiação ultravioleta com as placas de petri abertas a fim de eliminar as células formadoras de colônias (GROSS e VIDAVER, 1978). Uma variação dessa metodologia foi a exposição à radiação ultravioleta dos tubos de ensaio, mantidos em posição vertical, sem tampas de vedação e contendo a cultura líquida de PAL5<sup>T</sup> em 5 ml de meio DYGS, antes da incubação em meio sólido para o crescimento das células. Como controles foram utilizadas culturas não expostas ao clorofórmio e à radiação ultravioleta. Em todos os testes, foram utilizadas três placas por tratamento.

#### 1.2 Cultivo da estirpe alvo de antagonismo em sobrecamada

Seguiu-se a metodologia de antibiose por difusão em dupla camada descrita por Kékessy e Piguet (1970) com algumas modificações. Adicionou-se uma sobrecamada contendo 4 ml de meio DYGS fundente (45°C) com 1 ml de suspensão celular de *X. albilineans*. A análise de dados ocorreu após 24 horas de incubação por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição. Uma vez observada a formação de halo, foi realizada a medição de seu diâmetro.

#### 1.3 Avaliação do tempo de exposição à radiação ultravioleta para a indução de substâncias antagônicas

Colônias da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* foram inoculadas em um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio líquido DYGS, permanecendo sob agitação constante de 200 rpm a 30°C por 48 horas, enquanto a estirpe de *X. albilineans* foi cultivada por 24 horas. Três alíquotas de 100

µl de suspensão líquida de *G. diazotrophicus* foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS. A seguir, esses pontos foram submetidos à radiação ultravioleta por períodos de 5, 10, 20, 40 e 90 minutos para avaliar o melhor tempo de exposição à radiação para a indução de substâncias antagônicas. Após esse período, adicionou-se uma sobrecamada contendo 4 ml de meio DYGS semissólido (agar a 30%) e 1 ml de suspensão celular de *X. albilineans*. A análise de dados ocorreu de modo qualitativo por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição. Uma vez observado a formação de halo, houve a medição de seu diâmetro.

Outro experimento semelhante, utilizando o mesmo tempo de exposição à radiação, foi realizado com a substância antagônica extraída da bactéria. Um volume de 50 ml de suspensão líquida de *G. diazotrophicus* foi submetido à radiação ultravioleta por períodos de 5, 10, 20, 40 e 90 minutos para avaliar o melhor tempo de exposição para a indução de substâncias antagônicas e se estas eram excretadas pelas bactérias produtoras. Após esses períodos, as culturas foram centrifugadas a 18.514 x g e os sobrenadantes foram filtrados em filtro (miliporo) de 0,2 µm. Três alíquotas de 100 µl desse extrato foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS. O restante do procedimento seguiu-se como descrito acima.

#### **1.4 Sensibilidade da atividade antagônica em temperatura elevada**

Colônias da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* foram inoculadas em um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio líquido DYGS e permaneceram em agitação constante de 200 rpm a 30°C por 48 horas, enquanto a estirpe de *X. albilineans* foi cultivada por 24 horas. A suspensão líquida foi centrifugada, sendo o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 µm. O extrato foi adicionado a microtubos, os quais foram submersos em água a uma temperatura de 95°C por um período de 30, 60 e 90 minutos. Após esses períodos, três alíquotas de 100 µl desse sobrenadante foram dispostas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS. Adicionou-se uma sobrecamada contendo 4 ml de meio DYGS semissólido e 1 ml de suspensão celular de *X. albilineans*. A análise de dados ocorreu de modo qualitativo por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição. Uma vez observado a formação de halo, houve a medição de seu diâmetro.

#### **1.5 Indução da produção de bacteriocina de *G. diazotrophicus* e seu efeito contra *X. albilineans* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Uma colônia característica da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* foi inoculada em 5 ml de meio líquido DYGS e incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Após o crescimento, esse pré-inóculo foi adicionado a erlenmeyers de 125 ml contendo meio DYGS, a fim de se obter uma cultura de 10 ml com uma D.O. de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Em cada erlenmeyer contendo o inóculo, foram adicionadas diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 µM, 100 µM e 500 µM). A ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada como tratamento controle. Após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a cultura líquida ficou sob agitação durante 60 minutos a 30°C e 200 rpm. Após esse período, três alíquotas de 100 µl da suspensão celular foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS e incubadas por 24 horas. Foram utilizadas três repetições por tratamento. Paralelamente, retirou-se uma colônia característica da estirpe de ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*, a qual foi inoculada em 5 ml de meio DYGS e incubada por 24 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de incubação, esse inóculo foi utilizado para formar a sobrecamada sobre as alíquotas de *G. diazotrophicus* já incubadas anteriormente como já descrito acima. Desse modo, 1 ml da cultura de *X. albilineans* foi adicionada a 4 ml de meio DYGS semissólido e vertido sobre as placas já inoculadas previamente com *G. diazotrophicus*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A análise de dados ocorreu de modo qualitativo por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição. Para todos os testes, foram utilizadas três placas por tratamento.

## **2. Teste de antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar**

### **2.1 Antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* induzida por UV contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar (HRC54, HCC103, CBAmC, PPe8).**

Uma colônia característica da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* foi inoculada em 5 ml de meio líquido DYGS e incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Após o crescimento, a cultura foi ajustada para uma D.O. de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm, utilizando um espectrofotômetro. O tubo de ensaio contendo a cultura líquida foi mantido em posição vertical e sem tampa de vedação, e as culturas nele contido foram submetidas à radiação ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) por 20 minutos. Após esse período, três alíquotas de 100  $\mu$ l da suspensão celular foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS e incubadas por 24 horas. Como controles dos testes de antagonismo, foram utilizadas culturas não expostas à radiação ultravioleta. Para todos os testes, foram utilizadas três placas por tratamento.

Paralelamente, retirou-se uma colônia característica de cada estirpe que compõe o inoculante de cana-de-açúcar (estirpe HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, CBAmC de *Azospirillum amazonense* e PPe8 de *Burkholderia tropica*) das placas contendo seus meios semisseletivos [NFb (DÖBEREINER et al., 1995) modificado para HRC54 e HCC103, LGI (DÖBEREINER et al., 1995) para CBAmC e JMV (BALDANI et al., 2000) para PPe8]. Essas colônias foram inoculadas em 5 ml de meio DYGS e incubadas por 24 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de incubação, essas culturas foram utilizadas para formar a sobrecamada sobre as alíquotas de *G. diazotrophicus* já incubadas anteriormente conforme descrito acima. Desse modo, 1 ml de cada estirpe do inoculante foi adicionado a 4 ml de meio DYGS semissólido e vertido sobre as placas já inoculadas previamente com *G. diazotrophicus*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A análise qualitativa dos dados foi feita por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição. Uma vez observado a formação de halo, foi realizada a medição de seu diâmetro.

### **2.2 Antagonismo de *G. diazotrophicus* induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar**

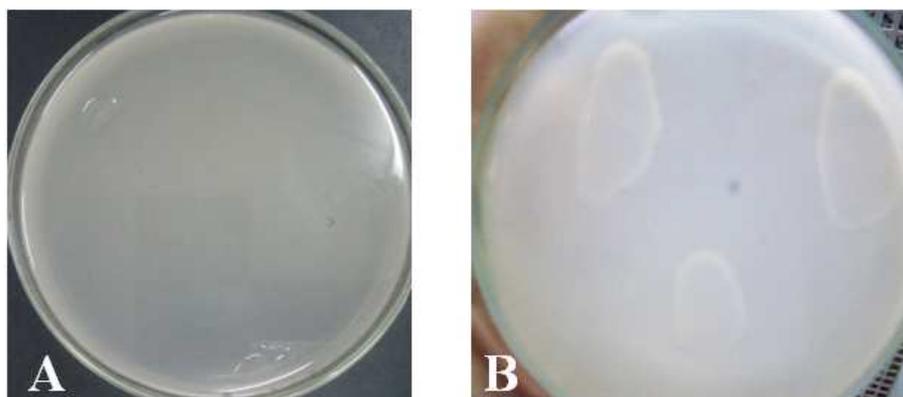
O mesmo experimento descrito acima foi utilizado para avaliar a influência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no antagonismo de *G. diazotrophicus* sobre as bactérias do inoculante. Uma colônia de PAL5<sup>T</sup> foi inoculada em 5 ml de meio líquido DYGS e incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Após o crescimento, o pré-inóculo foi adicionado em erlenmeyers contendo meio DYGS a fim de se obter uma cultura de 10 ml com uma D.O. de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Em cada erlenmeyer contendo o inóculo, foram adicionadas diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 500  $\mu$ M). A ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada como tratamento controle. Após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a cultura líquida ficou sob agitação durante 60 minutos a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após esse período, três alíquotas de 100  $\mu$ l da suspensão celular foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS e incubadas por 24 horas. Foram realizadas três repetições por tratamento. As estirpes HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, CBAmC de *Azospirillum amazonense* e PPe8 de *Burkholderia tropica* foram inoculadas em 5 ml de meio DYGS e incubadas por 24 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de incubação, essas culturas foram utilizadas para formar a sobrecamada sobre as alíquotas de *G. diazotrophicus* já incubadas anteriormente como já descrito no item anterior.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Teste de antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*

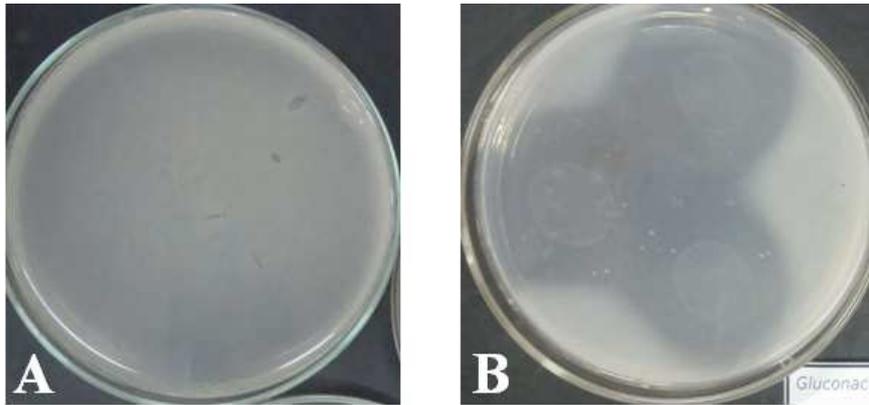
#### 1.1 Avaliação da indução de substâncias antagônicas

Não foi observado antagonismo da bactéria *G. diazotrophicus*, utilizada como produtora de substâncias antagônicas, contra a bactéria *X. albilineans*, quando o clorofórmio foi utilizado para a morte celular (Figura 8A). Como era esperado, também não foi observada a presença de halo no tratamento controle (ausência de exposição ao clorofórmio) (Figura 8B).



**Figura 8:** Antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans* aplicada em sobrecamada. A: células de PAL5<sup>T</sup> mortas pela adição de clorofórmio; B: controle negativo (células não tratadas com clorofórmio).

Segundo a literatura, resultados positivos de antagonismo foram observados quando utilizada a metodologia de antibiose por dupla camada com a adição de clorofórmio na avaliação de estirpes de *G. diazotrophicus* contra outras estirpes dessa mesma espécie (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005). Não está clara a razão do efeito observado contra outras estirpes da mesma espécie e não contra uma estirpe de outra espécie, porém é consenso que uma das características das substâncias antagônicas (dentre elas as bacteriocinas) é justamente seu potencial letal contra microrganismos filogeneticamente relacionados. Também não foi observada atividade antagônica contra *X. albilineans* quando as colônias já incubadas da *G. diazotrophicus* foram tratadas com radiação ultravioleta (Figura 9A). Existem diversos estudos de antagonismo entre bactérias que utilizam a exposição à radiação ultravioleta na metodologia empregada (KYEREMEH et al., 2000; BEGLEY et al., 2009). Nesses estudos, as estirpes com o potencial antagônico a serem testados são expostas à radiação ultravioleta no próprio meio que receberá a segunda camada. A finalidade do UV nestes estudos é assegurar a morte das bactérias e, conseqüentemente, excluir a possibilidade de que o antagonismo seja devido a alguma competição entre as duas bactérias a serem testadas, assim como induzir a produção de substâncias antagônicas. Entretanto, a presença de halo só foi observada quando a *G. diazotrophicus* foi irradiada com UV durante seu crescimento prévio em meio líquido (Figura 9B).



**Figura 9:** Antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*. A: exposição das colônias de PAL5<sup>T</sup> à radiação ultravioleta após o crescimento da bactéria na placa por 24 horas; B: Exposição da cultura líquida de PAL5<sup>T</sup> à radiação ultravioleta por 20 minutos, seguida da inoculação em placas contendo o meio de cultivo DYGS. Em ambos os casos, uma sobrecamada de meio de cultivo contendo *X. albilineans* foi inoculada após a incubação por 24 horas.

Os resultados apresentados sugerem que a radiação ultravioleta induziu a produção de compostos antimicrobianos na estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* durante a exposição das células no início da fase estacionária em meio de cultura líquida. A média do tamanho dos halos nas três repetições foi de 3,91 cm. A razão de a indução só ocorrer em *G. diazotrophicus* em cultura líquida ainda é desconhecido. É possível que a estrutura da colônia formada em meio sólido sirva como uma espécie de barreira física para a entrada da radiação UV, exportação de agentes antagonistas induzidos ou mesmo que a quantidade de substância liberada seja pequena e insuficiente para a formação de halo.

Tal mecanismo de indução de antagonismo foi demonstrado por Spangler et al. (1985), que sugerem que a produção de agentes antimicrobianos, como bacteriocinas, em bactérias gram-negativas é induzida pela presença de agentes que danificam o DNA ou por fatores ambientais como o aumento da densidade populacional ou falta de nutrientes. Quando essas bactérias são expostas à radiação ultravioleta, bacteriocinas são produzidas em larga escala (JAMES et al., 1996). Segundo os autores, o fator responsável por essa indução é o “sistema SOS de reparo do DNA”. Esse sistema é responsável por ativar uma proteinase denominada RecA, que, por sua vez, inativa a proteína LexA, que é repressora do gene que codifica a bacteriocina (SPANGLER et al., 1985). Já é consenso que a luz ultravioleta pode induzir a produção de bacteriocinas em bactérias gram-negativas (EXPERT; TOUSSAINT, 1985; MATSUI et al., 1993; PARRET et al., 2003; DE LOS SANTOS et al., 2005). Alguns estudos têm demonstrado que isso também pode ocorrer em bactérias gram-positivas (DUPUY et al., 2005).

Dupuy et al. (2005) concluíram que a expressão do gene plasmidial BCN5, que codifica uma bacteriocina na bactéria *Clostridium perfringens*, era dependente *in vivo* e *in vitro* da proteína UviA. Os autores observaram que um dos promotores do respectivo gene só foi induzido depois que as células foram submetidas à exposição de luz ultravioleta. Esse mecanismo mostrou-se conservado uma vez que a mesma dinâmica ocorreu em outras espécies de *Clostridium*, como: *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*. Já os trabalhos de De Los Santos et al. (2005) corroboraram as observações de Spangler et al. (1985). Os autores observaram que algumas espécies de *Pseudomonas* eram capazes de inibir o crescimento de certas estirpes de *P. putida* e *P. fluorescens*. Com a construção de mutantes aleatórios, foi possível selecionar fenótipos que não produziam bacteriocina. Da análise de sequenciamento de DNA das regiões mutagenizadas, os autores concluíram que essa característica se devia ao silenciamento do gene *recA*.

Trabalhos de Matsui et al. (1993) sugerem outras vias de regulação da síntese de bacteriocina, embora o mecanismo seja bastante semelhante. Como já descrito, muitos autores afirmam que a produção de piocinas em *Pseudomonas aeruginosa* é induzida pelo sistema de

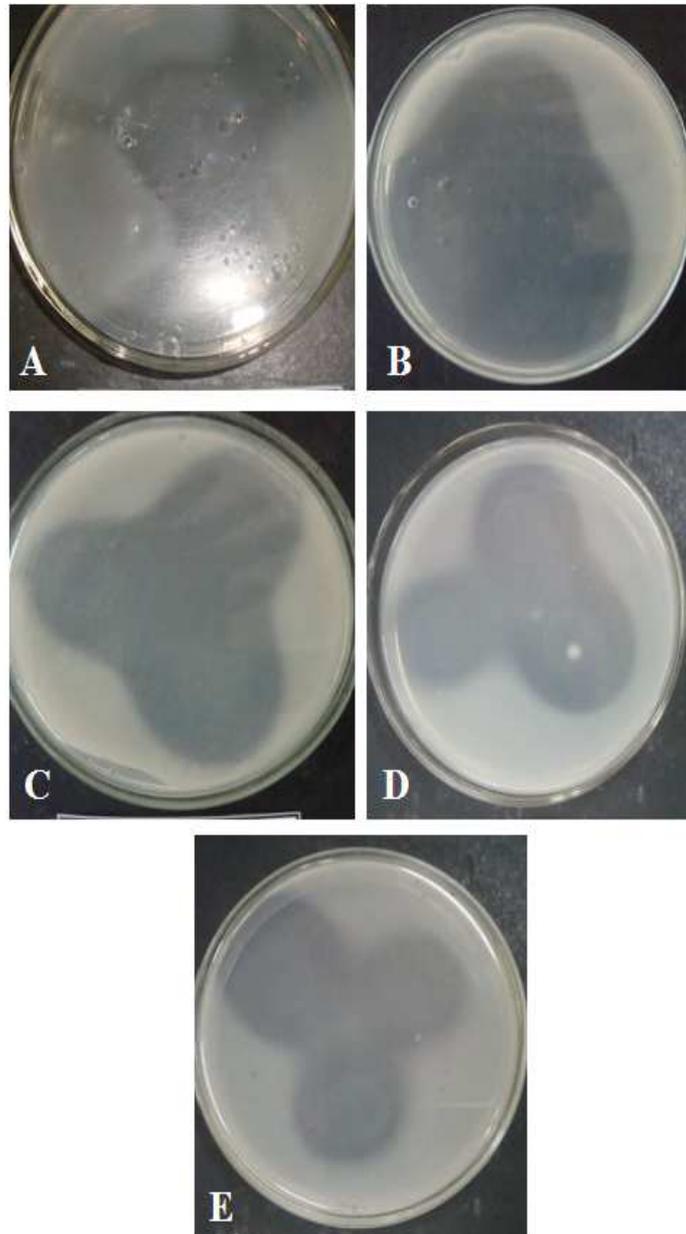
reparo SOS, dependente da proteína repressora LexA (SANO e KAGEYAMA, 1993; DE LOS SANTOS et al., 2005). Os autores demonstraram que mutantes deficientes na produção das piocinas R2, F2 e S2 possuíam o gene *prtN* defeituoso. Estudos por homologia não demonstraram qualquer tipo de relação entre esse gene e os genes *recA* ou *lexA*. Isso sugere que o gene *prtN* é um ativador de vários genes que codificam piocinas. Nesse mesmo trabalho, foi identificado o gene *prtR*, que seria um repressor do gene *prtN*. Por esse modelo de regulação, sob condições de não indução (como ausência de indução à luz ultravioleta), a expressão do gene de ativação *prtN* é bloqueada pelo repressor PrtR. Expostas as bactérias à luz ultravioleta ou a outro agente que possa causar danos ao DNA, o repressor PrtR é clivado pela proteína ativada RecA. Com a clivagem do gene *prtR*, o gene *prtN* é então expresso ativando a expressão dos genes que codificam a piocina em *P. aeruginosa*.

Entretanto, outros autores observaram atividade antagônica sem que as bactérias produtoras fossem submetidas a qualquer tipo de estímulo externo (OGUNBANWO et al., 2003; PARRET et al., 2005; ONBASLI e ASLIM, 2008; BARRETEAU et al., 2009). Trabalhos de Ogunbanwo et al. (2003) revelaram que a bacteriocina de bactérias lácticas, como *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, que produziu atividade inibitória contra diversas bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas, não foi induzida pela presença de luz ultravioleta quando comparada ao controle (sem indução). Barreteau et al. (2009) também observaram a formação de halos de *Pseudomonas fluorescens* contra a estirpe DET08 de *P. aeruginosa* sem qualquer tipo de indução externa. A expressão em *E. coli* dos genes *llpA1* e *llpA2*, que codificam a bacteriocina LlpA em *P. fluorescens*, também não aumentou quando as bactérias foram expostas à radiação UV (PARRET et al., 2005). Outra bactéria do solo que apresenta atividade antagônica sem a necessidade de indução por UV é a espécie *Paenibacillus peoriae*. A estirpe NRRL BD-62 dessa bactéria possui um grande potencial no controle biológico segundo Von Der Weid et al. (2003), pois, além de produzir substâncias antagônicas sem a necessidade de indução contra diversas bactérias (*Rhizobium tumefaciens*, *Micrococcus* sp., *Ralstonia solanacearum*), ainda é capaz de realizar fixação biológica de nitrogênio.

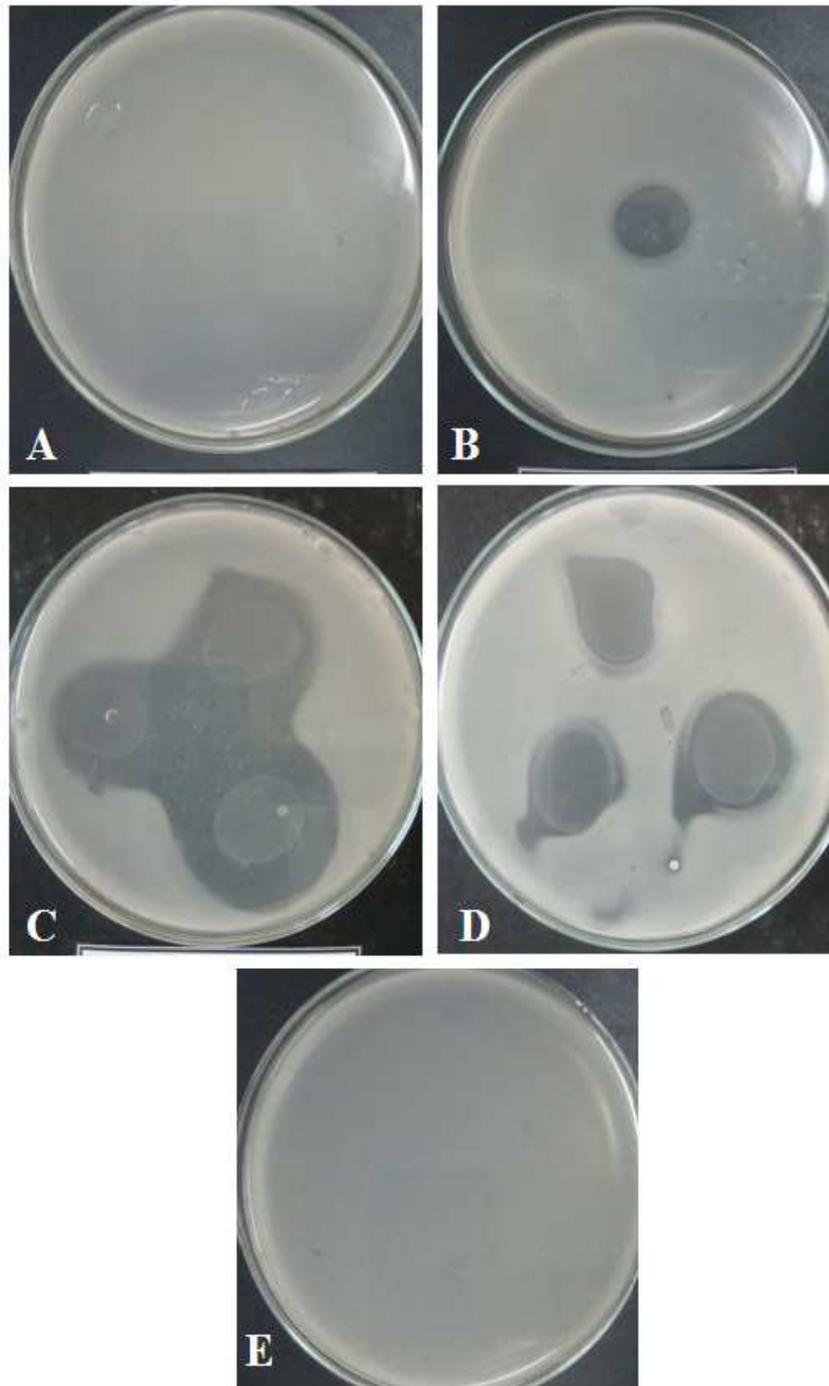
Experimentos de Muñoz-Rojas et al. (2005) mostraram que as estirpes PAL5<sup>T</sup>, PRX3, PRX6, PBD17 e PBD4 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* possuem a capacidade de inibir várias outras estirpes da mesma espécie. Os autores utilizaram a mesma metodologia para a avaliação do antagonismo, mas sem exposição das células à luz ultravioleta. A razão pela qual a estirpe PAL5<sup>T</sup> necessita de indução para inibir *X. albilineans* e que inibe o crescimento de outras estirpes de *G. diazotrophicus* espontaneamente ainda é desconhecida. Uma hipótese é que PAL5<sup>T</sup> sintetize a substância antagônica naturalmente, mas que os níveis de produção se limitem a uma quantidade baixa que controle apenas o crescimento de outras estirpes. Já para o antagonismo de *X. albilineans*, seria necessário uma indução externa que estimulasse uma maior produção de bacteriocina para esta ser efetiva. Outra hipótese seria a produção de mais de uma bacteriocina por *G. diazotrophicus*. Haveria, como decorrência, duas bacteriocinas: uma dependente de indução e que resultaria no antagonismo a *X. albilineans*; a outra, produzida naturalmente e que inibiria as outras estirpes de *G. diazotrophicus*. De fato, muitas espécies são capazes de produzir bacteriocinas distintas no mesmo microrganismo (GAJIC et al., 1999). Em bactérias lácticas, por exemplo, como na estirpe BGMN 1-5 de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, são produzidas dois tipos distintos de bacteriocina, inclusive com massas diferentes (20 kDa e de 10 kDa). Dessa forma, a síntese de mais de uma bacteriocina em *G. diazotrophicus*, além de não ser improvável, pode ser certamente possível.

## 1.2 Avaliação do tempo de exposição à radiação ultravioleta para a indução de substâncias antagônicas

O efeito do tempo de exposição da radiação ultravioleta a 254 nm sobre a indução do efeito antagônico foi avaliado nos tempos de 5, 10, 20, 40 e 90 minutos em culturas em suspensão líquida e no extrato celular de *G. diazotrophicus* são apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente.



**Figura 10:** Efeito do tempo de exposição à radiação ultravioleta sobre a indução da síntese de substâncias antagônicas em suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans*. As Figuras das letras A a E mostram os resultados da exposição à radiação por 5, 10, 20, 40 e 90 minutos, respectivamente.



**Figura 11:** Efeito do tempo de exposição à radiação ultravioleta do extrato celular de *G. diazotrophicus* sobre a indução da síntese de substâncias antagonistas contra a bactéria *X. albilineans*. As Figuras das letras A a E mostram os resultados da exposição à radiação por 5, 10, 20, 40 e 90 minutos, respectivamente.

Na primeira avaliação (Figura 10), em que suspensões líquidas de *G. diazotrophicus* foram expostas à radiação, foi observado que o tratamento de cinco minutos de exposição se mostrou inferior quanto à indução do antagonismo aos demais (Figura 10A). Esse período foi insuficiente para que o efeito antagônico tenha sido completamente induzido. O halo de inibição contra a bactéria *X. albilineans* foi maior com 10 e 20 minutos (Figura 10B e C), decrescendo gradativamente com tempos maiores de exposição (Figura 10D e E).

No segundo experimento (Figura 11), adotou-se o mesmo tempo de exposição à radiação, porém foi utilizado o extrato celular. Verificou-se que não houve indução da atividade antagônica nos tempos de 5 e 90 minutos (Figura 11 A e E). Já com o tempo de irradiação de 10 e 40 minutos, observou-se a formação de halo apenas na margem em que o extrato celular foi inoculado (Figura 11 B e D). O tempo de 20 minutos de exposição à radiação ultravioleta foi o que se mostrou mais satisfatório para a indução de substâncias antagônicas contra a bactéria *X. albilineans*.

Resultados semelhantes foram observados por Khalil et al. (2009) quando a bactéria *Bacillus megaterium* foi exposta a diferentes períodos de luz ultravioleta (15, 30, 60 e 90 minutos) em ensaios de culturas líquidas com o extrato celular contra as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, sendo o tempo de 30 minutos o que acarretou a maior redução de crescimento. Na caracterização da bacteriocina produzida pelas estirpes Ech25 e Ech33 de *Pectobacterium chrysanthemi*, Echandi e Moyer (1979) testaram vários tempos de indução da bacteriocina à luz ultravioleta (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos) no extrato celular. Os autores concluíram que os tempos de 0,5 e 1 minuto foram os mais eficientes para a indução da atividade antagônica. Diferenças entre a bacteriocina e a metodologia empregada nos trabalhos com *P. chrysanthemi* e *G. diazotrophicus* podem ser observadas. Em primeiro lugar, a síntese de bacteriocina em *P. chrysanthemi* ocorre espontaneamente, sem a necessidade de indução. A luz ultravioleta apenas estimulou uma maior produção da bacteriocina em *P. chrysanthemi*, uma vez que esta já era produzida naturalmente. Outra diferença está na metodologia empregada na radiação. No caso da bactéria *P. chrysanthemi*, seu extrato foi colocado em placas de petri e irradiado. A superfície de radiação foi muito maior que em tubos de ensaio em que a *G. diazotrophicus* foi exposta. Para ter a mesma quantidade de radiação, esta necessitaria de muito mais tempo de exposição para ter o mesmo efeito que nos experimentos de Echandi e Moyer (1979). Por último, os autores utilizaram as mesmas estirpes como o microrganismo a ser inibido. É consenso na literatura que uma das características das bacteriocinas é seu poder letal contra bactérias filogeneticamente próximas (IVANOVICS, 1962; YONEZAWA et al., 2008; KAMOUN et al., 2009; MALDONADO-BARRAGÁN, 2009). Entretanto, em muitos trabalhos, o antagonismo se dá entre bactérias de grupos diferentes (JABRANE et al., 2002; ZIHLER et al., 2009; IZQUIERDO et al., 2009; REA et al., 2010). É possível que certas bacteriocinas tenham mais facilidade de inibir bactérias do mesmo grupo do que de grupos diferentes e, por isso, a necessidade de menor tempo de indução.

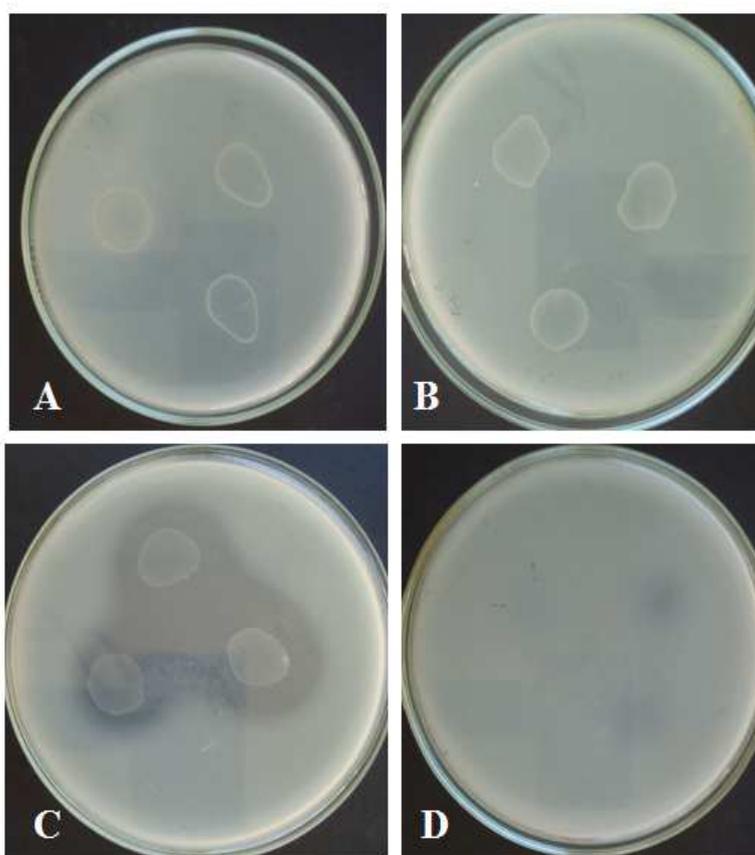
### **1.3 Sensibilidade da atividade antagônica a temperatura elevada**

Munõz-Rojas et al. (2005), estudando a produção de substâncias antagônicas entre as 55 estirpes de *G. diazotrophicus*, também avaliaram a estabilidade térmica da bacteriocina advinda do extrato celular. Os autores concluíram que, após 1 hora a 95 °C, a atividade antagônica ainda permanecia. No entanto, esta foi perdida quando esse período foi estendido para 2 horas ou mais. Para se avaliar a possibilidade de se tratar da mesma substância, foi realizado um experimento no qual o extrato celular de *G. diazotrophicus* sofreu um tratamento térmico também a 95°C por diferentes períodos de tempo (30, 60 e 90 minutos). Nessa avaliação, a substância antagônica produzida pela bactéria *G. diazotrophicus* não foi resistente ao tratamento térmico de 95°C por 30 minutos. A bactéria *X. albilineans* conseguiu se desenvolver pela placa como um todo, não havendo a formação de halo. A partir dessa constatação, pode-se sugerir que as substâncias encontradas em

ambos os estudos não são as mesmas e que talvez *G. diazotrophicus* possa produzir mais de uma substância antagonista. Mais estudos são necessários para se avaliar a termoestabilidade da bacteriocina sintetizada contra *X. albilineans*. Como já discutido anteriormente, alguns microrganismos produzem mais de uma bacteriocina (GAJIC et al., 1999). Os trabalhos de Krier et al. (1998) demonstraram que as duas bacteriocinas sintetizadas pela estirpe FR52 de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* possuíam até características químicas diferentes. A temperatura pode influenciar significativamente na produção de bacteriocina, sendo 20°C a temperatura ótima para a bacteriocina mesenterocina 52A e 25°C, para a mesenterocina 52B.

#### 1.4 Indução da produção de substâncias antagonistas de *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi capaz de induzir o antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> contra *X. albilineans* na concentração de 100 µM (Figura 12). A média dos halos produzidos pela PAL5<sup>T</sup> foi de 2,55 cm. As concentrações de 25 e 500 µM não induziram a formação de halos no meio de cultivo.



**Figura 12:** Avaliação da indução da atividade antagonista por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (0, 25, 100 e 500 µM) na síntese de substâncias antagonistas contra *X. albilineans*. As figuras das letras A a D mostram os resultados da exposição a 0, 25, 100 e 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.

As concentrações selecionadas foram baseadas no trabalho de Kemp et al. (2004) e de Meneses (2010), que avaliaram diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e *G. diazotrophicus*, respectivamente. Meneses (2010) observou que a estirpe PAL5<sup>T</sup> não sobreviveu quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 1000 µM foi adicionado à suspensão líquida. Além disso, observou que a sobrevivência de *G. diazotrophicus* foi de 80% na concentração de 500 µM. Em contraste, neste trabalho, *G. diazotrophicus* não conseguiu sobreviver na concentração de 500 µM.

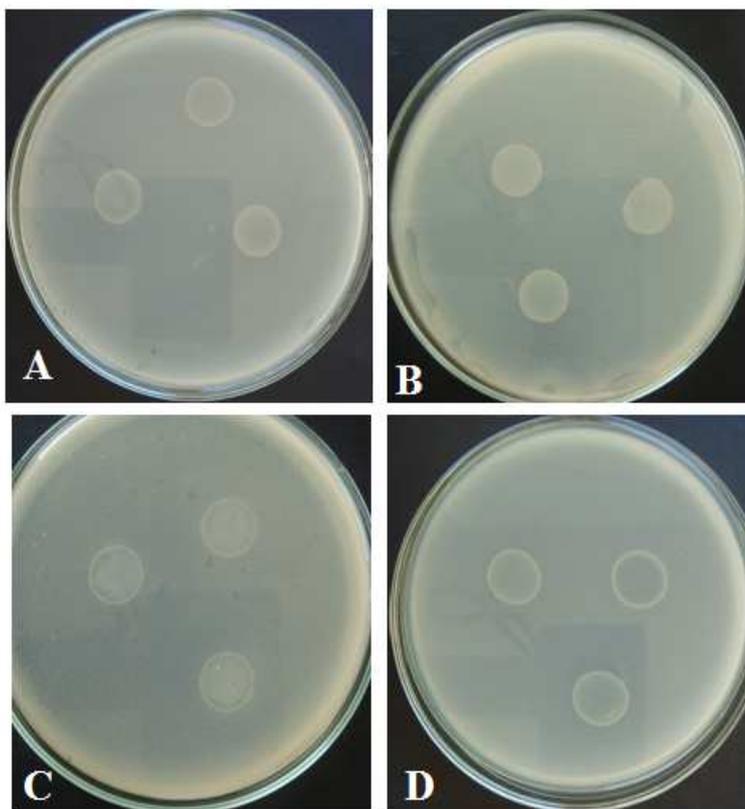
O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pode estar presente e provir de diversas fontes. Muitas vezes, é um componente secundário derivado da reação da superóxido dismutase que catalisa a dismutação do superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e  $H_2O_2$ . Muitas oxidases como a D-aminoácido oxidase podem ser fontes de  $H_2O_2$  (FARR e KOGOMA, 1991). Eisenstark (1989) também já demonstrou que o peróxido de hidrogênio é um fotoproduto da irradiação ultravioleta. Além disso, a partir do  $H_2O_2$ , na presença de ferro, é possível produzir outras espécies ativas de oxigênio, como o radical hidroxila (OH $\cdot$ ), por meio da reação de Fenton. As células expostas ao  $H_2O_2$  causam quebra na fita do DNA na presença de  $Fe^{+2}$  (IMLAY e LINN, 1986). A fita de DNA quebrada induz a resposta SOS de reparo do DNA (LITTLE e MOUNT, 1982).

No trabalho de Ananthaswamy e Eisenstark (1977), o tratamento com  $H_2O_2$  resultou na indução da quebra dos deoxiribonucleicos em fita simples de DNA. Essa quebra foi reparada parcialmente nos mutantes defectivos de *polA1*, *recA* e *recB*, e reparada totalmente nas estirpes selvagens. Já Carlson e Carpenter (1980) demonstraram que mutantes de *E. coli* defectivos na síntese da proteína *recA* são muito sensíveis ao  $H_2O_2$ , sendo esta a principal proteína responsável pela sobrevivência das células após a exposição ao peróxido (IMLAY e LINN, 1987). Carlson e Carpenter demonstraram que, em *E. coli*, o produto do gene *recA* é mais importante na proteção contra os efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio do que as próprias enzimas catalase e a superóxido dismutase. Segundo Cascales et al. (2007), em *E. coli*, após danos ao DNA por agentes mutagênicos e carcinogênicos, a expressão da *recA* também estimula a autoclivagem do repressor LexA, permitindo a transcrição do operon da colicina. O mesmo mecanismo foi encontrado em outras bactérias. Em espécies de *Klebsiella*, foram encontrados sequências codificantes apresentando grande similaridade com as encontradas em *E. coli* (CHAVAN et al., 2005). O mesmo foi observado em Enterobacteriaceas (CURSINO et al., 2002). Com base nessas informações, pode-se sugerir que muito provavelmente a substância antagonista presente em *G. diazotrophicus* seja mesmo uma bacteriocina, uma vez que o sistema SOS de reparo do DNA, ativado por diversas substâncias como peróxido de hidrogênio, tem a capacidade de ativar a transcrição dessa proteína.

## **2. Teste de antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar**

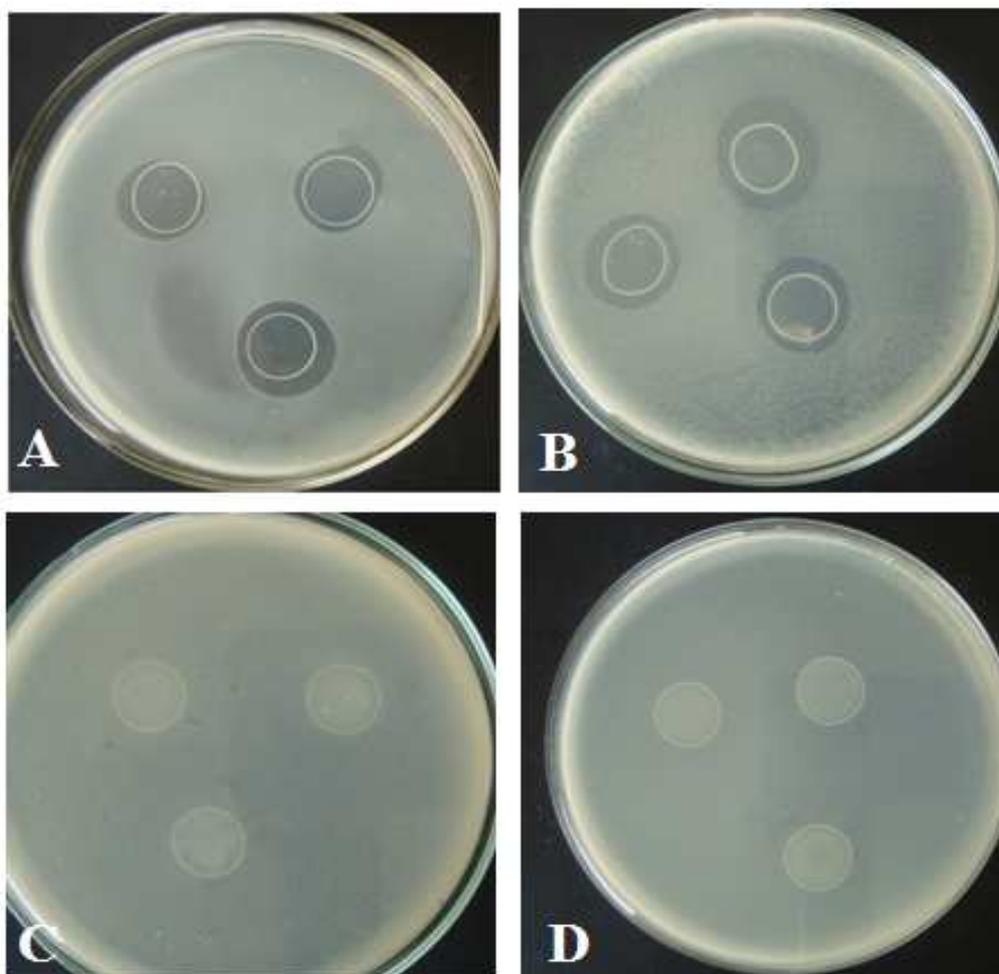
### **2.1 Avaliação da indução de substâncias antagonistas por radiação ultravioleta**

Não foi observado antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> contra nenhuma das estirpes do inoculante (HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, CBAmC de *Azospirillum amazonense* e PPe8 de *Burkholderia* spp.) nos tratamentos em que a estirpe PAL5<sup>T</sup> não foi submetida a radiação ultravioleta (Figura 13).



**Figura 13:** Antagonismo de *G. diazotrophicus* contra as bactérias que compõem o inoculante. As estirpes das figuras são: A: HRC54 de *H. seropedicae*, B: HCC103 de *H. rubrisubalbicans*, C: CBAmC de *A. amazonense* e D: PPe8 de *B. tropica*.

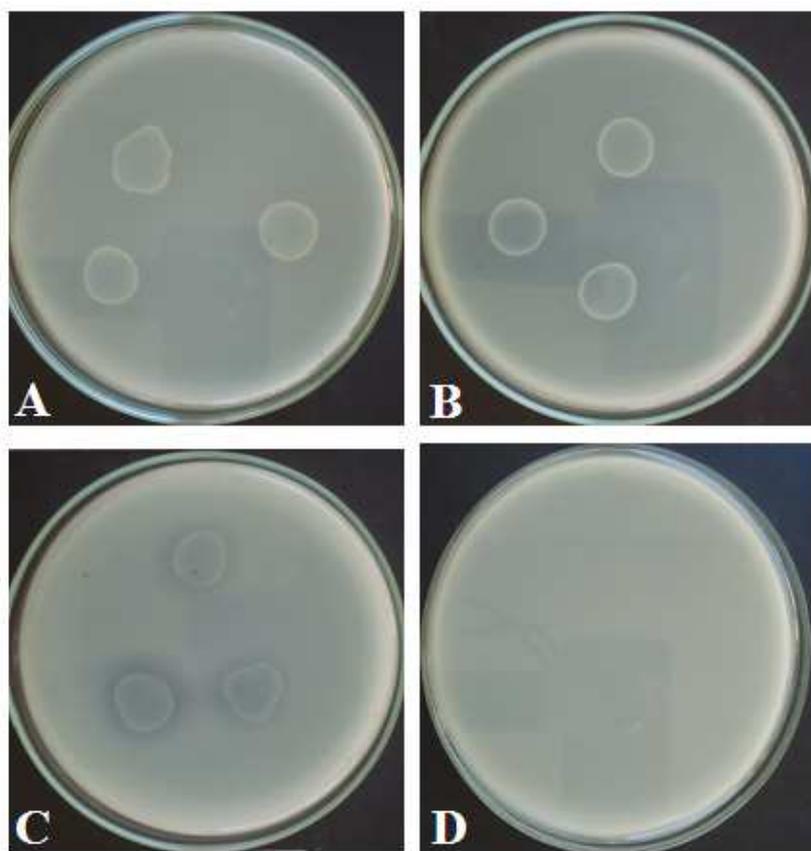
Entretanto, quando a cultura líquida da estirpe PAL5<sup>T</sup> foi exposta a UV, foi observado halo de inibição no crescimento em ambas as espécies de *Herbaspirillum* (Figura 14). A média do diâmetro dos halos de inibição na estirpe HRC54 de *H. seropedicae* e na estirpe Hcc de *H. rubrisubalbicans* foi de 1,79 e 1,83 cm, respectivamente.



**Figura 14:** Antagonismo de *G. diazotrophicus* expostas a radiação UV por 20 minutos contra as bactérias que compõem o inoculante. As estirpes das figuras são: A: HRC54 de *H. seropedicae*, B: HCC103 de *H. rubrisubalbicans*, C: CBAmC de *A. amazonense* e D: PPe8 de *B. tropica*.

## 2.2 Indução da produção de bacteriocina de *G. diazotrophicus* contra as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar por $H_2O_2$ .

Os resultados do experimento da avaliação de  $H_2O_2$  sobre o antagonismo de PAL5<sup>T</sup> demonstraram a ausência de antagonismo da estirpe HRC54, CbamC e PPe8 em todas as concentrações utilizadas (figura não demonstrada). Foi observado um antagonismo fraco contra a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans*, tanto no experimento cuja cultura líquida de PAL5<sup>T</sup> foi submetida a radiação UV ( $\chi_{halo} = 1,83$  cm) (Figura 14) quanto na adição de  $H_2O_2$  na concentração de 100  $\mu$ M ( $\chi_{halo} = 1,62$  cm) (Figura 15). Como no experimento de indução do antagonismo de PAL5<sup>T</sup> contra *X. albilineans* por  $H_2O_2$ , a concentração de 500  $\mu$ M ocasionou a morte celular da estirpe produtora.



**Figura 15:** Avaliação da indução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (0, 25, 100 e 500 µM) na síntese de substâncias antagonísticas contra a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans*. As figuras das letras A a D mostram os resultados da exposição a 0, 25, 100 e 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.

Na literatura, existem poucos trabalhos abordando a produção de substâncias antagonísticas por *G. diazotrophicus* contra outros microrganismos. Os organismos testados contra seu antagonismo foram: as bactérias *X. albilineans* (PIÑON et al., 2002; BLANCO et al., 2005; ARENCIBIA et al., 2006), *G. johannae*, *G. azotocaptans*, *G. liquefaciens*, *G. oxidans*, *G. hansenii*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *Azospirillum brasilense*, *Frateuria aurantia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhizobium sp.*, *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium meliloti* (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005); o fungo *Colletotrichum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY, 2000) e o nematoide *Meloidogyne incognita* (BANSAL et al., 2006). Das bactérias citadas acima, apenas *X. albilineans* (PIÑON et al., 2002; BLANCO et al., 2005; ARENCIBIA et al., 2006), *G. azotocaptans*, *G. johannae* e *G. liquefaciens* (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005) tiveram inibição em seu crescimento. Na inibição das diferentes espécies de *Gluconacetobacter* avaliada por Muñoz-Rojas et al. (2005), a bacteriocina produzida não necessitou ser induzida por nenhum agente externo, como radiação UV ou adição de peróxido de hidrogênio. Porém, com esse tratamento, não foi observado o antagonismo entre bactérias filogeneticamente distantes. Como já discutido anteriormente, uma hipótese sugerida é que a bacteriocina avaliada por Muñoz-Rojas et al. (2005) seja diferente da detectada neste trabalho.

O estudo do efeito inibitório de *G. diazotrophicus* contra as demais bactérias diazotróficas que também compõem o inoculante, é pioneiro e inédito. Os estudos de avaliação da interação entre as bactérias que compõem o inoculante são fundamentais para melhorar o potencial biotecnológico dessas bactérias no aumento da produtividade de cana-de-açúcar e demais gramíneas. A partir desses resultados, pode-se concluir que a estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* não é capaz de produzir substâncias antagonísticas contra as bactérias que compõem o inoculante em condições de

não indução (quando não exposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou radiação UV). No ambiente, sabe-se que os organismos são expostos a raios UV oriundos da luz solar; entretanto, é possível que *G. diazotrophicus* esteja protegida da radiação por ser um microrganismo endofítico. Sendo assim, a própria planta poderia atuar como uma barreira protegendo esse microrganismo dos raios UV, não acarretando assim antibiose contra as estirpes do inoculante.

Entretanto, sabe-se que a inoculação de *G. diazotrophicus* pode ativar processos de defesa do hospedeiro (DE CARVALHO et al., 2011). Lambais et al. (2001) estudaram *in silico* a expressão diferencial de genes de defesa de cana-de-açúcar quando esta foi inoculada com bactérias diazotróficas endofíticas. Esses autores observaram a superexpressão do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintetase (NOS1) nas plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*. Segundo Clark et al. (2000), o óxido nítrico está envolvido na regulação do acúmulo de peróxido de hidrogênio durante o processo de defesa ao patógeno, inibindo as atividades da catalase e peroxidase. Curiosamente, esse gene foi reprimido em plantas inoculadas com *H. rubrisubalbicans* (LAMBALIS et al., 2001). Segundo o autor, quando a cana-de-açúcar é inoculada com *H. rubrisubalbicans* não há indução sistêmica dos genes de mecanismo de defesa enquanto que essa resistência sistêmica é observada em plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*. Sendo assim, mais estudos são necessários visando à avaliação da interação das bactérias do inoculante dentro da própria planta de cana-de-açúcar no intuito de se avaliar a presença de peróxido de hidrogênio liberada pela planta e se sua quantidade é capaz de induzir a síntese de compostos antimicrobianos.

## CONCLUSÕES

- i) O método de antibiose por dupla camada com radiação UV das suspensões líquidas de *G. diazotrophicus* se mostrou eficiente para a avaliação de seu antagonismo contra *X. albilineans* e as bactérias do inoculante.
- ii) A radiação ultravioleta estimula a produção de substâncias antagônicas pela estirpe PAL5<sup>T</sup> da bactéria endofítica *G. diazotrophicus*, tanto para a suspensão bacteriana quanto para o sobrenadante em meio líquido, contra a bactéria *X. Albilineans*.
- iii) Foi observado antagonismo contra a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* pela estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus*, quando estas foram submetidas à radiação UV.
- iv) O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na concentração de 100 µM induziu o antagonismo de PAL5<sup>T</sup> contra *X. albilineans* e contra *H. rubrisubalbicans*.
- v) A estirpe PAL5<sup>T</sup>, na ausência de indução, não apresentou antibiose contra nenhuma das bactérias testadas.

## CAPÍTULO II

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DEFECTIVOS EM GENES QUE CODIFICAM A BACTERIOCINA DO TIPO LINOCINA M18 E UM TRANSPORTADOR DE BACTERIOCINA EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* ESTIRPE PAL5<sup>T</sup>**

## RESUMO

A produção de substâncias antagonicas por bactérias diazotróficas endofíticas tem se mostrado uma nova ferramenta no controle biológico de doenças que atacam culturas como a cana-de-açúcar. Diversas substâncias antagonicas de origem proteica, denominadas bacteriocinas, já mostraram seu potencial biotecnológico contra diversas bactérias fitopatogênicas. O objetivo deste trabalho foi identificar genes relacionados à bacteriocina no genoma de *G. diazotrophicus* e avaliar seu possível envolvimento antagonico contra *X. albilineans*, agente etiológico responsável pela escaldadura das folhas em cana-de-açúcar. As ORFs (GDI\_0415 e GDI\_3499) presentes no genoma de *G. diazotrophicus* e anotadas como uma bacteriocina e seu transportador foram selecionadas e analisadas por ferramentas de bioinformática. Foi construída uma árvore filogenética para cada ORF com o objetivo de se avaliar a similaridade desses genes em relação a outros microrganismos. Além disso, as duas ORFs foram amplificadas com iniciadores específicos, clonadas e inativadas utilizando o transposon EZ::Tn5<KAN-2>. Os mutantes defectivos na bacteriocina e no transportador foram então validados molecularmente por PCR de colônia e PCR invertido. Foram avaliados possíveis efeitos pleiotrópicos sobre a fisiologia da bactéria tais como tempo de geração em meio líquido, morfologia de colônia em meios específicos, produção de auxina e avaliação da atividade da enzima nitrogenase. A análise da árvore filogenética construída para a bacteriocina mostrou a formação de dois grandes ramos, um composto por bactérias da família das *Burkholderiaceae* e outro por bactérias do grupo das  $\alpha$ -*proteobactérias*. Já as bactérias da árvore filogenética do transportador agruparam-se no filo das *Proteobactérias*. Não foram observadas diferenças morfológicas nas colônias dos mutantes quando crescidos tanto no meio sólido LGI-P quanto em Batata-P. Foram observados efeitos pleiotrópicos para a produção de auxina e atividade da nitrogenase uma vez que os mutantes produziram significativamente menores teores de AIA e etileno, respectivamente. A estirpe selvagem e o mutante MUTGDI\_3499 inibiram o crescimento de *X. albilineans* após a exposição da cultura líquida de PAL5<sup>T</sup> à luz ultravioleta. Em contraste, não foi observado presença de halo na bactéria quando crescido na presença do mutante para a ORF GDI\_0415. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 100  $\mu$ M induziu a produção de bacteriocina na estirpe selvagem. Entretanto esse efeito não foi observado para os mutantes contra *X. albilineans*. Os resultados obtidos sugerem que a ORF GDI\_0415 está envolvida na produção de uma bacteriocina, possivelmente responsável pela inibição do crescimento de *X. albilineans*, e se constituindo num potencial biotecnológico de aplicação no controle biológico em cana e outras plantas.

**Palavras-chaves:** Genômica funcional, antagonismo, bacteriocina

## ABSTRACT

The antagonistic substances produced by endophytic diazotrophic bacteria have been shown as a new tool in the biological control of disease that attack crops such as sugar cane. Several antagonistic substances are of protein origin and are known as bacteriocins and has already been shown its biotechnological potential against many phytopathogenic bacteria. The objective of this work was to identify genes related to bacteriocin synthesis in the *G. diazotrophicus* genome and evaluate their possible antagonist role against *X. albilineans*, an etiologic agent responsible for the leaf scald of sugarcane. The ORFs (GDI\_0415 and GDI\_3499) present in the genome of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, anoted as a bacteriocin and its transporter, were identified and analyzed by informatic tools. A phylogenetic tree was constructed for each ORF in order to evaluate their similarity in relation to other organisms. In addition, the ORFs were amplified with specific primers, cloned and insertionally inactivated using the EZ::Tn5<KAN-2><sup>T</sup> transposon. The mutants defective in bacteriocin synthesis and transport were then validated by colony and reverse PCR. It was also evaluated possible pleiotropic effects on the physiology of the mutants such as growth rate in liquid medium, biofilm formation on LGI-P semi-solid media, colony morphology in specific media, nitrogenase activity and indol production. The production of the antagonistic substance was compared with the wild-type using the double layer diffusion after exposing the strains to ultraviolet light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in different concentrations. Analysis of the phylogenetic tree for the bacteriocin showed the formation of two major branches, one within the *Burkholderiaceae* family and the other within the  $\alpha$ -proteobacteria group. On the other hand, the phylogenetic tree of the transporter grouped the bacteria within the *Proteobacteria* class. No morphological differences were observed in mutant colonies grown in LGI-P and Potato-P solid medium. It was observed pleiotropic effect in relation to indol production and nitrogenase activity since both mutants produced significantly lower levels of IAA and ethylene, respectively. The wild-strain and the mutant MUTGDI\_3499 produced inhibition halo on confluent plates against the target organism *X. albilineans* after exposing PAL5<sup>T</sup> cells to UV light. In contrast, the GDI\_0415 mutant did not produce any inhibition halo. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) induced the bacteriocin production in wild-strain. However, no antagonism was observed in the mutants against *X. albilineans* in presence of peroxide. These results suggest that the ORF GDI\_0415 is involved in the bacteriocin production, which is possibly responsible for growth inhibition of *X. albilineans* and therefore constituting in a enormous biotechnological tool for biological control of sugarcane and possible other plants.

**Keywords:** Functional genomic, antagonism, bacteriocin

## INTRODUÇÃO

O elemento nitrogênio é essencial na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos dentre outras estruturas celulares. Embora seja o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (78,1% em volume), os vegetais não são capazes de metabolizá-lo na forma gasosa retirando-o diretamente do ar. A transformação do N atmosférico em formas assimiláveis para os vegetais (Fixação Biológica de Nitrogênio) é realizada por bactérias denominadas diazotróficas (PEDRAZA, 2008).

O primeiro relato sobre a ocorrência da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *G. diazotrophicus* ocorreu em 1988 por Cavalcante e Döbereiner. Isolada do interior das raízes e colmo foi descrita como sendo uma bactéria gram-negativa, microaerófila e resistente a baixos valores de pH (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988). Alguns estudos já demonstraram que a inoculação de *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar acarretou plantas mais altas e com maior produtividade (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; SEVILLA et al., 2001). Além dos benefícios da FBN, essa bactéria tem a capacidade de promover o crescimento vegetal pela síntese de compostos indólicos, além de solubilizar nutrientes minerais e promover o antagonismo contra fitopatógenos (SARAVANAN et al., 2007).

Dentre os fatores que afetam negativamente a produtividade da cana-de-açúcar, é possível destacar a ocorrência de doenças e de pragas. Das doenças, uma de causa bacteriana de grande relevância é a escaldadura das folhas, cujo agente etiológico é *Xanthomonas albilineans* (TOKESHI, 1997; COMSTOCK e LENTINI, 2002). Esta é uma doença de difícil diagnose e controle, uma vez que não existem variedades resistentes e nem medidas fitossanitárias eficazes para o seu controle (ROSS, 2004). Diversos estudos têm demonstrado o possível controle biológico de pragas e doenças por bactérias endofíticas, uma vez que estas habitam o interior da planta podendo, hipoteticamente, competir pelos mesmos sítios de colonização com patógenos, produzir substâncias antagonicas e acionar mecanismos de resistência da planta hospedeira (SARAVANAN et al., 2007).

Muthukumarasamy et al. (2000) observaram o antagonismo de *G. diazotrophicus* contra o fungo *Colletotrichum falcatum*, responsável pela podridão vermelha na cultura de cana-de-açúcar. Em outro estudo, tanto *G. diazotrophicus* quanto *G. azotocaptans* apresentaram efeito inibitório contra diversas espécies de *Fusarium* em experimentos *in vitro* (MEHNAZ e LAZAROVITS, 2006). Também já foi relatado antagonismo *G. diazotrophicus* contra certos nematoides. Bansal et al. (2006) detectaram uma redução da eclosão de ovos e paralisação de ninfas de *Meloidogyne incognita* quando estes foram expostos ao extrato celular da bactéria. Já Piñon et al. (2002) observaram antagonismo contra a bactéria *X. albilineans*, agente etiológico de escaldadura da folha em cana-de-açúcar. Nesse trabalho, os autores sugerem que *G. diazotrophicus* é capaz de secretar certas proteínas denominadas de bacteriocinas que impedem o crescimento do fitopatógeno por meio do rompimento da parede celular. Substâncias semelhantes foram avaliadas por Muñoz-Rojas et al. (2005) cujo estudo identificou antagonismo entre diferentes estirpes de *G. diazotrophicus*.

Graças aos esforços de diversas instituições de pesquisa associadas ao Projeto Genoma do Rio de Janeiro (RioGene), financiado pela Faperj e CNPq, a *G. diazotrophicus* foi a terceira bactéria diazotrófica endofítica cujo genoma foi completamente sequenciado, após *Azoarcus sp.* (KRAUSE et al., 2008) e *Klebsiella pneumoniae* (FOUTS et al., 2008). O genoma completo é composto de um cromossomo circular de 3.944.163 pares de bases (pb), contendo 3.864 sequências codantes; e de dois plasmídeos contendo 38.818 e 16.610 pb, respectivamente (BERTALAN et al., 2009). Por meio de anotação genômica, algumas ORFs (fase de leitura aberta), relacionados à síntese e transporte de bacteriocinas já foram identificadas. Dentre elas, destaca-se a ORF GDI\_0415, anotada como uma bacteriocina denominada Linocina M18 e a ORF GDI\_3499 apresentada como um transportador ABC que exporta bacteriocina para o meio externo. A possibilidade de *G.*

*diazotrophicus* poder também conferir resistência a patógenos é bastante interessante. O estudo desses genes e a caracterização molecular pela utilização da engenharia genética poderão ajudar o entendimento da síntese e expressão de bacteriocinas visando ao uso dessa bactéria não só na fixação biológica de nitrogênio mas também no controle biológico de certos fitopatógenos.

## OBJETIVOS

Avaliar o papel dos genes anotados e relacionados à produção de bacteriocina de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no processo de antagonismo contra *Xanthomonas albilineans* por meio da:

- i) identificação de possíveis genes relacionados à síntese e ao transporte de bacteriocinas;
- ii) geração de mutantes sítio-dirigidos de *G. diazotrophicus*;
- iii) avaliação do antagonismo da estirpe selvagem e dos mutantes gerados de *G. diazotrophicus* contra a bactéria *X. albilineans*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Obtenção das sequências de aminoácidos relacionados à bacteriocina e sua regulação

A primeira etapa dos estudos de comparação e correlação dos genes envolvidos na síntese e transporte da bacteriocina foi a análise detalhada das informações já disponíveis para a localização e caracterização de sequências relacionadas às proteínas em estudo.

As sequências anotadas, relacionadas à síntese e transporte da bacteriocina, foram submetidas à busca, por similaridade, no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), por meio do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), visando-se, assim, determinar a similaridade destas com sequências já depositadas no referido banco de dados. O alinhamento múltiplo de todas as sequências foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALX, versão 1.82 (THOMPSON et al., 2002).

### 2. Predição da estrutura secundária, regiões transmembranares e análise filogenética da bacteriocina e do seu respectivo transportador.

A predição da estrutura secundária foi realizada com o programa PSIPRED v.2.3 (MCGUFFIN, 2000). Já para a predição das possíveis regiões transmembranares, utilizou-se o programa TOPPRED 2 (VON HEIJNE, 1992). Para a análise filogenética, as sequências anotadas das duas ORFs de interesse foram submetidas à busca, por similaridade, no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) por meio do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) com o objetivo de encontrar sequências similares em outros organismos. Uma vez encontradas, as sequências alinhadas foram submetidas ao programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versão 4.0 (KUMAR et al., 2001) para a realização das análises filogenéticas envolvendo métodos de distância, utilizando distribuições  $\gamma$  (gamma), com parâmetro calculado pelo programa ModelTest. As análises de *bootstrap* para testar a confiança nas topologias obtidas foram realizadas em todos os métodos utilizados. Para os métodos de distância foram realizadas 1.000 repetições do conjunto de dados.

### 3. Construção dos mutantes sítio-dirigidos para bacteriocina e seu transportador

#### 3.1 Desenho de iniciadores específicos

Das sequências anotadas no banco de dados do NCBI, foram selecionadas duas ORFS (GDI\_0415 e GDI\_3499) para a síntese de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a realização de estudos de mutações sítio-dirigidas. A primeira ORF codifica uma provável bacteriocina da família das linocinas M18 e a segunda traduz uma proteína responsável pelo transporte membranar de bacteriocinas. Pela análise realizada pelo programa pDRAW, verificou-se a ausência dos sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *HindIII* nas duas sequências selecionadas. A partir disso, essas enzimas foram utilizadas para a construção dos iniciadores pelo programa Vector NTI (Gorelenkov et al., 2001): GDI\_0415-sense (5' – AAA GCTTATGAACAATCTGCATCGG3-3'), GDI\_0415-antisense (5'-GTGAATTCCGCTTCG TTCTTCGCAG-3'); GDI\_3499-sense (5'-CTAAGCTTGCCCTCCTGCCCTCGG3-3') e GDI\_3499-antisense (5'-CTGAATTTCGCGAGATCAACCTGGTG-3').

#### 3.2 Amplificação dos fragmentos selecionados

Com os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados, foi realizada a amplificação dos genes selecionados a partir do genoma da *G. diazotrophicus*. A reação foi constituída de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão

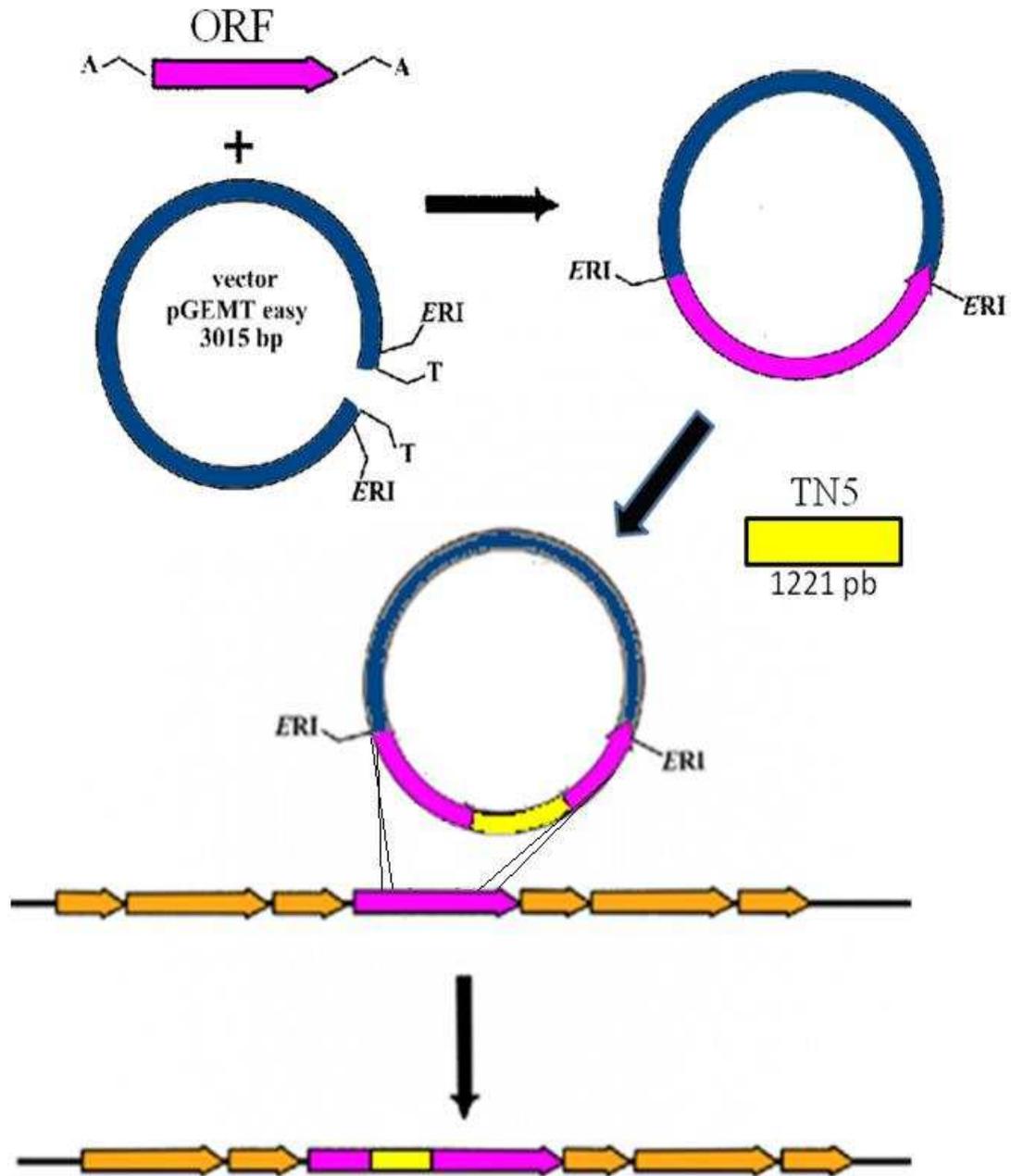
para *Taq* DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl) (Invitrogen, Cat. No. 11615-010), 10  $\mu$ M de cada iniciador e 200 ng de DNA total de PAL5<sup>T</sup>.

As condições de temperatura empregadas nas reações de PCR foram: 5 min a 95°C (desnaturação), 1 min a 95°C (desnaturação), 1 min a 65°C (anelamento), 2 min a 72°C (polimerização), retorno 29 vezes para a segunda etapa, 5 min a 72°C (polimerização) e, finalmente, 4°C. Para a verificação da amplificação dos genes de interesse, 5  $\mu$ l dos produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose a 1% (m/v) em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) e submetidos a uma voltagem de 90 V por 90 minutos. Os géis foram então corados com brometo de etídeo (5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz ultravioleta a 254 nm, com o uso do fotodocumentador KODAK<sup>®</sup> Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. No. 172.8468). A análise dos géis foi realizada com o programa de análise de imagens da KODAK<sup>®</sup> 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. No. 811.2344). Como referência nas análises, foi empregado o marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Cat. No. 10787-018)

### 3.3 Estratégia de clonagem para interrupção dos genes para a síntese e transporte de bacteriocina

A estratégia de clonagem e interrupção das ORFs GDI\_0415 e GDI\_3499 de *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> está representada na Figura 16. Os produtos de PCR gerados foram ligados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Cat. No. 293843), gerando os plasmídeos recombinantes contendo as ORFs de interesse. Estes foram transferidos para a estirpe DH10B de *E. coli* (GRANT et al., 1990), sendo os transformantes selecionados em meio LB suplementado com ampicilina (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), IPTG (0,5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) e X-Gal (50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). As ORFs presentes nestas construções foram interrompidas in vitro pela inserção do transposon EZ::TN<KAN-2> (Epicentre, Cat. No. EZI982K) e os clones de *E. coli* estirpe DH10B obtidos foram selecionados pelo plaqueamento em meio LB suplementado com ampicilina (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) e canamicina (50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>).

Células eletrocompetentes de *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> foram preparadas e transformadas com 1  $\mu$ g de cada plasmídeo recombinante contendo a ORF de interesse interrompida, conforme protocolo descrito a seguir. A integração por meio de recombinação homóloga das construções no genoma ocorreu por meio de recombinação dupla (ORF::Tn5), em que os transformantes foram selecionados por plaqueamento em meio DYGS suplementado com canamicina (200  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). Visto que *G. diazotrophicus* não consegue manter plasmídeos derivados de pGEM<sup>®</sup>-T Easy como uma unidade de replicação autônoma, porque esses plasmídeos possuem uma origem de replicação (*rep* do replicon pMB1) que não é reconhecida por essa bactéria, as ORFs fornecidas por esse vetor só poderão ser mantidas em *G. diazotrophicus* se a ela se integrarem em uma unidade de replicação (o cromossomo) de *G. diazotrophicus*. A integração por meio de recombinação homóloga das construções no genoma pode ocorrer por meio de recombinação simples ou dupla. Porém, nesse caso, esperou-se uma recombinação dupla para que o gene selvagem fosse substituído pela versão mutante (ORF::Tn5), sendo esta a situação esperada. O sucesso da mutagênese das ORFs foi confirmado através de análises de PCR de colônia e PCR invertido.



**Figura 16:** Desenho esquemático de clonagem e inativação para as ORFs GDI\_0415 e GDI\_3499 pela inserção de transposon Tn5 (Modificado de MENESES 2010).

### 3.4 Ligação dos genes amplificados no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Os genes amplificados foram ligados ao plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega<sup>®</sup>) para facilitar as etapas posteriores de clonagem. As concentrações de inserto e vetor foram estimadas a partir da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1X de uma alíquota destes DNAs. Os sistemas de ligação possuíram volume final de 20 µl, contendo de 50 a 500 ng de vetor, T4 DNA ligase 1-2U e tampão de ligação 1X concentrado (300 mM de Tris-HCl, pH 7,8; 100 mM de MgCl<sub>2</sub>; 100 mM de DTT e 10 mM de ATP). As concentrações dos componentes e o pH do

tampão de ligação variaram de acordo com o fabricante. O sistema de reação foi mantido a 16°C por aproximadamente 16 h (SAMBROOK et al., 2000).

### 3.4.1 Precipitação da ligação

Foram adicionados 2 µl de NaOAc (3M, pH 5,5) e 40 µl de etanol absoluto gelado no volume total da ligação das ORFs que codificam uma bacteriocina e seu transportador (GDI\_0415 e GDI\_3499) com o vetor pGEM-T Easy. A solução foi incubada a -20°C por 16 horas. Após o tempo de incubação, a solução foi centrifugada por 30 minutos a 18.514 x g. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao sedimento 300 µl de etanol a 70%. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 18.514 x g. Descartou-se mais uma vez o sobrenadante, e os microtubos foram postos para secar em temperatura ambiente. Com o microtubo bem seco, o sedimento foi ressuscitado em 10 µl em água ultrafiltrada (sistema MilliQ™) livre de DNase.

### 3.5 Eletrocompetência e eletroporação da estirpe DH10B de *Escherichia coli*

Colônias da estirpe DH10B de *E. coli* foram crescidas em 15 ml de meio LB e incubadas por 16 horas sob agitação de 200 rpm a 37°C. Após este período, 10 ml de cultura fresca foi inoculada em 50 ml de meio LB e acondicionados em quatro erlenmeyers de 125 ml. Os erlenmeyers foram incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm até que a cultura atingisse uma D.O.<sub>600nm</sub> entre 0,5 e 0,8. Com a D.O. atingida, distribuiu-se a cultura em frascos estéreis de tubo de propileno (tipo falcon), sendo estes centrifugados a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado com água ultrafiltrada (sistema MilliQ™) estéril gelada. Essa etapa de lavagem foi repetida por três vezes. Centrifugou-se mais uma vez por 10 minutos a 6000 x g a 4 °C e as células foram ressuscitadas com 10 ml de glicerol gelado a 10%. A lavagem com glicerol foi realizada por mais duas vezes. Foram distribuídas alíquotas de 100 µl das células em microtubos para criogenia até o momento do uso.

Uma alíquota de 50 µl de células eletrocompetentes de DH10B foram eletroporadas com 1 µl do vetor pGEM®-T Eeasy contendo cada uma das ORFs de interesse (GDI\_0415 e GDI\_3499) em eletrocubetas incubadas no gelo. As cubetas as suspensões de células foram submetidas a um pulso elétrico de um eletroporador ajustado em 1,8 KV, 25 µF e 129 Ω. Imediatamente após a passagem da corrente, adicionou-se 1 ml de meio na cubeta e todo o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio estéril. Os tubos então foram incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm por 1 hora. Após a incubação, as culturas bacterianas foram plaqueadas em meio sólido LB contendo o antibiótico ampicilina (100 µg.ml<sup>-1</sup>), X-gal (80 µg.ml<sup>-1</sup>) e IPTG (0,5 mM). Para cada eletroporação, foram realizados três plaqueamentos com 50, 100 e 200 µl de células com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

### 3.6 Extração plasmidial das células de DH10B de *E. coli*

Para a confirmação da clonagem dos genes de interesse no plasmídeo pGEM®-T Eeasy em *E. Coli*, foi realizada uma extração plasmidial segundo o protocolo de Sambrook et al. (2000).

Uma colônia de DH10B contendo o vetor com o gene de interesse (GDI\_0415 e GDI\_3499) foi transferida para um tubo contendo 5 ml de meio LB com ampicilina (100 µg.ml<sup>-1</sup>). A cultura foi incubada por cerca de 16 horas a 37°C sob agitação de 120 rpm. Desses tubos, 1,5 ml de cultura foi transferida para microtubos de 1,5 ml e centrifugada a 12.000 x g por 30 segundos a 4°C. O meio foi removido por aspiração. O sedimento bacteriano foi ressuscitado em 100 µl da solução I (50 mM de glicose; 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de EDTA, pH 8,0), 200 µl da solução II (0,2 N de NaOH; 1% de SDS) e 150 µl da solução III (5 M de Acetato de potássio; 11,5 ml de Ácido Acético Glacial; 28,5 ml de H<sub>2</sub>O) (SAMBROOK et al., 2000). A solução foi centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Após essa fase, transferiu-se para o tubo um volume equivalente à mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico

(25:24:1) e o tubo foi centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600 µl de isopropanol em temperatura ambiente. Novamente a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi removido por aspiração. O sedimento foi então lavado com 1 ml de etanol a 70% , secado e ressuspensionado em 50 µl de TE (pH 8,0) contendo RNaseA (20 µg.ml<sup>-1</sup>).

Para a visualização e verificação da extração do plasmídeo pGEM-T Easy, 5 µl do plasmídeo extraído foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v).

### 3.7 Digestão plasmidial do vetor pGEM-T Easy por enzimas de restrição

Para a confirmação da inserção dos genes de interesse no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, este foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* para a liberação do inserto. A reação foi realizada de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante.

### 3.8 Inserção do transposon Tn5 nas ORFs de interesse

Uma vez extraído o plasmídeo, foi inserido o transposon Tn5 (com gene de resistência à canamicina). Esse transposon se insere aleatoriamente no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy. A reação foi feita com a utilização do kit de inserção transposon EZ:: TN<sup>TM</sup> <KAN-2> da Epicentre. A reação foi realizada de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante. O microtubo com a reação foi incubado por 2 horas a 37°C. Após esse período, a solução foi interrompida com 1 µl de EZ::TN 10X Stop Solution e aquecida por 10 minutos a 70°C.

### 3.9 Eletrocompetência e eletroporação da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus*

A metodologia empregada para a preparação de células eletrocompetentes de *G. diazotrophicus* foi a descrita por Rows et al. (2006). Uma pré-cultura foi obtida a partir de uma colônia cultivada em placa fresca de meio DYGS, onde esta foi cultivada sob agitação de 200 rpm a 30°C, em erlenmeyer com volume de 2 l, contendo 200 ml de meio C2. A cultura cresceu até atingir uma D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6-0,7. Após o crescimento, o erlenmeyer contendo as células foi resfriado sobre gelo por 30 min. A cultura foi então distribuída em quatro tubos do tipo Falcon, com 50 ml cada, e submetida à centrifugação em rotor de ângulo fixo (centrífuga Eppendorf 5810R), a 2.900 x g por 10 min e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados em posição invertida sobre papel absorvente para que todo sobrenadante fosse removido. O sedimento bacteriano foi então lavado duas vezes com 50 ml glicerol 10% gelado (ressuspensionados e centrifugados), e, em seguida, ressuspensionado em um volume final de 4 ml de glicerol 10% gelado. Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µl, em microtubos de 1,5 ml, e armazenadas a -70°C até serem usadas na transformação por eletroporação.

Alíquotas de 100 µl de células eletrocompetentes de *G. diazotrophicus* foram descongeladas sobre gelo por aproximadamente 10 minutos. Em eletrocubetas com espaço de 2 mm (Bio-Rad, Cat. No. 165-2082) previamente geladas, adicionou-se aproximadamente 500 ng de DNA e 100 µl de células eletrocompetentes, preparadas conforme descrito anteriormente. A eletrocubeta então foi inserida entre os eletrodos do equipamento “electro cell manipulator 600” (BTX, San Diego, CA, U.S.A.) e foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 186Ω, em modo “high voltage”, 2,5 kV, constante de tempo de aproximadamente 0,8 ms. Imediatamente após o pulso, 2 ml de meio C2 foram adicionados. A suspensão de células em meio C2 foi homogeneizada e transferida para um tubo de ensaio e este incubado por 16 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm para possibilitar a recuperação das células. As células foram então distribuídas em placas com meio sólido DYGS contendo 200 µg.ml<sup>-1</sup> de canamicina. As placas foram incubadas a 30°C durante três dias, até que as colônias pudessem ser visualizadas.

### 3.10 Obtenção dos mutantes insercionais de *G. diazotrophicus*

Foram obtidas colônias em placas com meio DYGS, suplementado com canamicina 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , após a transformação das células eletrocompetentes da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> com a construção contendo as ORFs interrompidas. Essas colônias foram repicadas para placas contendo meio DYGS, suplementado com ampicilina 500  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  para selecionar os mutantes com recombinação homóloga dupla. Os clones resultantes da recombinação homóloga simples apresentaram resistência para canamicina (do elemento de transposição) e ampicilina (do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Eeasy) e desta forma foram descartados. Com isto, foi possível obter o mutante para cada ORF específica, capaz de crescer apenas em meio contendo canamicina (200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ), sendo, portanto, um mutante gerado pelo evento de recombinação homóloga dupla. No caso de recombinação dupla, o gene selvagem é substituído pela versão mutante (GDI\_0415::Tn5 e GDI\_3499::Tn5). A recombinação dupla é caracterizada por não conter o plasmídeo vetor integrado no genoma.

### 3.11 Extração do DNA total da estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup> e dos mutantes para bacteriocina e transportador em *G. diazotrophicus*

A extração do DNA total foi realizada com o método CTAB. Para a extração do DNA total, as estirpes mutantes e selvagem de *G. diazotrophicus* foram cultivadas em 5 ml de meio DYGS líquido. Alíquotas de 2 ml das culturas crescidas foram centrifugadas a 18.514 x g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado. As células foram ressuspensas em 567  $\mu\text{l}$  de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA) sendo adicionados posteriormente 30  $\mu\text{l}$  de uma solução de SDS (10%) e 3  $\mu\text{l}$  de proteinase K (20  $\text{mg.ml}^{-1}$ ). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C durante 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de uma solução de NaCl 5 M, seguidos de 80  $\mu\text{l}$  de uma solução de CTAB (CTAB 10% em NaCl 0,7 M). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 65°C. Após o tempo de incubação, a solução foi submetida a uma agitação leve por 1 hora em temperatura ambiente. Uma alíquota de 780  $\mu\text{l}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionada às amostras, que ficaram sob agitação por um período de 1 hora. A solução então foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Após a transferência do sobrenadante para um novo tubo, foram adicionados 5  $\mu\text{l}$  de RNaseA (5  $\text{mg.ml}^{-1}$ ), e a amostra incubada a 37°C por 1 hora. Um volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, vol./vol.) foi adicionado e a solução foi homogeneizada por 2 minutos por inversão dos tubos e centrifugada por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). O material foi homogeneizado durante 2 min., centrifugado (10 min., 18.514 x g, 4°C) e transferido para novos tubos. O passo seguinte foi a adição de 0,6 volumes de isopropanol 100% e a incubação das amostras por 30 minutos a -20 °C. Após o tempo de incubação, o material foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Seguiram-se três etapas de lavagem com etanol 70%, secagem e solubilização em 100  $\mu\text{l}$  de tampão TE.

## 4. Caracterização genotípica dos mutantes sítio-dirigidos que codificam a bacteriocina linocina M18 e um transportador de bacteriocina em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

### 4.1 Verificação das ORFs mutageneizadas de *G. diazotrophicus* por PCR de colônia

As confirmações da presença de inserções do elemento EZ::Tn5 nos genes desejados foram realizadas por meio de análises de PCR colônia. Todas as reações de PCR foram realizadas usando o kit *Taq* polymerase (Invitrogen), com os oligonucleotídeos específicos para cada mutante. As reações foram realizadas usando material de colônia como molde para a amplificação. No caso do

PCR de colônia, as colônias foram inoculadas nas pré-misturas dos componentes da reação, em que o DNA (1 µl) da reação normal foi substituído pela mesma quantidade de água e inoculação com material de colônia. Os outros componentes permaneceram na mesma concentração equimolar citada anteriormente para amplificação das ORFs.

## 4.2 Confirmação das ORFs mutageneizadas de *G. diazotrophicus* por PCR invertido

### 4.2.1 Digestão e ligação do DNA molde

Alíquotas de 1 µg de DNA total foram digeridas durante 2 horas a 37°C em volumes de 100 µl com enzima de restrição *Pst*I. Após este período, as enzimas foram inativadas por aquecimento, durante 20 minutos a 80°C para *Pst*I. Após a digestão, o material foi tratado com T4 DNA ligase a 16°C por cerca de 16 horas. As amostras então foram precipitadas pela adição de 15 µl de NaOAc (7,5 M) e 300 µl de etanol absoluto durante 30 minutos a -20°C, centrifugadas a 18.514 x g por 30 min, a 4°C, lavadas com etanol 70% e ressuspensas em 50 µl de água ultrafiltrada (sistema MilliQ™) livre de DNase.

### 4.2.2 PCR invertido

Dois pares de oligonucleotídeos foram utilizados para as reações de PCR invertido [FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e RP-1 (5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3' conforme descrito por Rouws et al. (2008). As condições de amplificação por PCRi foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, com um etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos e finalização a 4°C.

### 4.2.3 Sequenciamento das regiões flanqueadores do transposon EZ-Tn™ <KAN-2>Insertion-kit

O produto gerado pelo PCR invertido foi purificado pela adição de água ultrafiltrada (sistema MilliQ™) livre de DNase até completar 32 µl. Foram adicionados 8 µl de NaCl 5M e 40 µl de PEG-8000 a 22%. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 16 horas a 10°C. As amostras então foram precipitadas como já descrito anteriormente e centrifugadas a 18.514 x g, a 4°C por 15 minutos, e posteriormente lavadas com 500 µl de etanol 70% gelado. Após o descarte do etanol e sua evaporação, o produto foi ressuspensado em 20 µl de água ultrafiltrada (sistema MilliQ™) livre de DNase e armazenado a -20°C.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Life Sciences, Cat. No. US81090) para o sistema de análise de DNA MegaBACE™. As reações foram realizadas pela adição do reagente *DYEnamic ET terminator reagent premix* presente no *kit*, de oligonucleotídeos iniciadores PF1 e PR1 e água ultrafiltrada (sistema MilliQ™) livre de DNase ao produto do PCR invertido e purificado. A reação de amplificação consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 min. Em seguida, o produto dessa reação foi precipitado por meio da adição de 1 µl de NH<sub>4</sub>Ac 7,5 M e 27,5 µl de etanol 100%, sendo incubado a 4°C por 16 h. Logo após, o produto foi recuperado por centrifugação (3.220 x g, 30 min, 4°C) e o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70% e, após a evaporação total do etanol 70%, o produto foi ressuspensado em 7,5 µl de tampão de amostra para sequenciamento. Após 2 h a 4°C, as amostras foram injetadas no sequenciador MegaBACE™1000 (GE Healthcare Life Sciences, Inc., USA).

## 5. Caracterização fenotípica dos mutantes sítio-dirigidos que codificam a bacteriocina linocina M18 e um transportador de bacteriocina em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

### 5.1 Morfologia das colônias em meios específicos

Uma alíquota de 10 µl de uma cultura, crescida por 24 horas, da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* e de seus mutantes para a síntese e transporte de bacteriocina foi riscada em placas contendo os meios sólidos LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995) e Batata-P (DÖBEREINER et al., 1995). Aos meios onde cresceriam os mutantes, foi adicionado canamicina na concentração de 200 µg.ml<sup>-1</sup>. A caracterização fenotípica foi realizada de acordo com Döbereiner et al. (1995).

### 5.2 Perfil de crescimento das estirpes PAL5<sup>T</sup> e mutantes para a síntese e transporte de bacteriocina

Uma colônia característica tanto da estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup> quanto dos mutantes foi inoculada em 5 ml de meio líquido DYGS e incubada por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C. Após esse período, diluiu-se o pré-inóculo para que se inoculasse uma D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,01.ml<sup>-1</sup> em erlenmeyers de 125 ml, contendo 10 ml de meio DYGS. Foram realizadas três repetições. Os erlenmeyers foram incubados em estufa de 30°C e a medição de absorvância e contagem das unidades formadoras de colônias foi analisada no tempo de 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas.

Para as medições de absorvância nos períodos das coletas, 200 µl da cultura foram transferidos para uma placa de *deepwell* transparente para então ser realizada a leitura em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 600 nm. O meio DYGS sem bactérias foi utilizado como branco.

#### 5.2.1 Contagem das unidades formadoras de colônias

Alíquotas de 100 µl das culturas das estirpes de *G.diazotrophicus* foram diluídas serialmente em 900 µl de solução salina estéril (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>). Foram retirados 10 µl de cada diluição e inoculados em placas contendo o meio LGI-P. As contagens foram realizadas com três repetições por diluição. Após o período de incubação, a contagem das colônias formadas foi realizada por meio de uma binocular estereoscópica. O número final de colônias foi obtido pela média aritmética das repetições.

O número de gerações (n) foi obtido pela seguinte fórmula (Rodrigues, 2008):

$$n = 3,3 ( \log N - \log N_0 ),$$

em que log N representa a população final e log N<sub>0</sub>, a população inicial na fase log.

O tempo de geração designado por g (o tempo que leva para uma população dobrar de número) foi determinado pelo número de gerações (N) que ocorre em um intervalo de tempo (t).

$$g = T_{x_h}/n$$

A taxa de crescimento (k) foi obtida pela fórmula:

$$k = 1/g$$

### 5.3 Produção de ácido indol acético (AIA)

Uma colônia característica tanto da estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup> quanto dos mutantes foi inoculada em 5 ml de meio líquido LGI-P sem corante, contendo 10 mM de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> como fonte de nitrogênio com L-triptofano (100 µg.ml<sup>-1</sup>) e incubada no escuro por 48 horas sob agitação de 200 rpm a 30°C, com três repetições. A quantificação de AIA foi realizada pela metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995). A quantificação é colorimétrica, tendo sido utilizado o reagente de Salkowski para análises em microplaca (Rodrigues et al., 2007). As culturas foram centrifugadas por 15 minutos sendo que 150 µl de cada sobrenadante foram transferidos para microplacas de poliestireno a que foi adicionado 100 µl do reagente de Salkowski. Após 30 minutos de incubação no escuro e em temperatura ambiente, a intensidade de coloração foi avaliada num comprimento de onda de 540 nm utilizando o espectrofotômetro Labsystems iEMS Reader MF. Os dados de absorbância foram processados pelo programa Ascent Software for iEMS Reader MF e plotados em um gráfico de dispersão do programa Microsoft Office Excel, 2007.

#### 5.3.1 Realização da curva de calibração

Para a realização da curva de calibração, utilizou-se o reagente ácido indol acético (Vetec) nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 700, 800, 900 e 1000 µm.ml<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 150 µl de cada diluição foi transferida para uma microplaca de poliestireno a que foi adicionado 100 µl do reagente de Salkowski. Após 30 minutos de incubação no escuro e em temperatura ambiente, a intensidade de coloração foi avaliada num comprimento de onda de 540 nm utilizando o espectrofotômetro Labsystems iEMS Reader MF. Os dados obtidos pela leitura da absorbância a 540nm foram utilizados na quantificação de auxinas pela aplicação da equação  $y = 137,83x - 10,728$  da curva de calibração, em que y corresponde à quantidade de auxina expressa em µg.ml<sup>-1</sup> e x, ao valor da D.O.<sub>540nm</sub>.

### 5.4 Crescimento em meio de cultivo sem nitrogênio

Uma alíquota de 10 µl de uma cultura, crescida por 24 horas, da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* e seus mutantes para a síntese e transporte de bacteriocina foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio LGI-P semissólido. O objetivo desse experimento foi a observação da formação de película, indicativo de uma ativa capacidade de fixação biológica de nitrogênio. O meio inoculado de LGI-P semissólido foi incubado por 4 dias a uma temperatura de 30°C.

### 5.5 Avaliação da atividade da enzima nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase foi medida pela técnica da detecção da Atividade de Redução de Acetileno (ARA), utilizando-se meio de cultivo semissólido. Uma alíquota de 10 µl de culturas líquidas, crescidas por 24 horas, da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> e dos mutantes foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio semissólido LGI-P sem corante. Os frascos foram incubados a 30°C. Nos dias de coleta (dias 5, 6 e 7 dias após a inoculação), as rolhas de algodão dos frascos foram trocadas por tampas de borracha perfurável do tipo “sub-seal”, estéreis. As culturas presentes nos frascos receberam 1 ml de acetileno, sendo incubadas em seguida por 30 minutos a 30°C. Posteriormente, 0,5 ml da fase gasosa do frasco foi injetada, com o auxílio de uma seringa, em cromatógrafo de gás com ionização por chama, marca Perkin Elmer, modelo F11 (Perkin Elmer, Japan, Yokohama, Japan), que permitiu a quantificação do etileno formado pela reação de redução do acetileno. Um segundo experimento foi realizado inoculando 10 µl de culturas líquidas, crescidas por 24 horas, da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> e dos mutantes em frascos contendo 5 ml de meio semissólido LGI-P sem corante e com diferentes concentrações de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (0,1 e 10 mM). Os frascos foram incubados a 30°C por 6 dias. Após esse período, as rolhas de algodão dos frascos foram trocadas por tampas de borracha perfurável do tipo *sub-seal* estéreis. As culturas presentes

nos frascos receberam 1 ml de acetileno sendo incubadas em seguida por 30 minutos a 30°C. A quantificação de etileno foi realizada como descrita anteriormente.

## **6. Teste de antagonismo da estirpe selvagem e mutantes para produção e transporte de bacteriocina de *G. diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans***

### **6.1 Teste de antagonismo induzido por UV**

Uma colônia característica da estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup>, do mutante defectivo para a produção de bacteriocina e de seu transportador foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio líquido DYGS, permanecendo em agitação constante de 200 rpm a 30°C. Os pré-inóculos foram incubados por 48 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de incubação, o tubo de ensaio contendo as culturas líquidas da estirpe selvagem e dos mutantes foram mantidos em posição vertical e sem tampa de vedação e submetidos a radiação ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) por 20 minutos. Após esse período, três alíquotas de 100  $\mu$ l da suspensão celular de cada bactéria foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS e incubadas por 24 horas. Como controles dos testes de antagonismo foram utilizadas culturas não expostas à radiação ultravioleta. Para todos os testes, foram utilizadas 3 placas por tratamento.

Paralelamente, retirou-se uma colônia característica da estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*, a qual foi inoculada em 5 ml de meio DYGS e incubada por 24 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de incubação, essas culturas foram utilizadas para formar a sobrecamada sobre as alíquotas de *G. diazotrophicus* já incubadas anteriormente, como já descrito acima. Desse modo, 1 ml de cada estirpe do inoculante foi adicionado em 4 ml de meio DYGS fundente semissólido e vertido sobre as placas já inoculadas previamente com *G. diazotrophicus*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A análise de dados ocorreu de modo qualitativo por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição.

### **6.2 Teste de antagonismo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

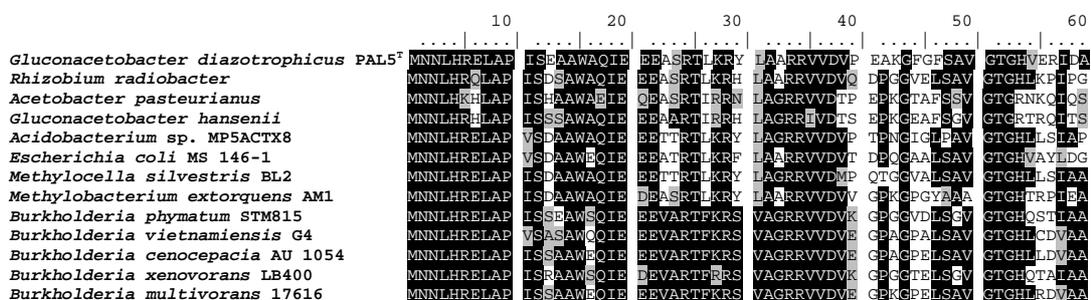
Uma colônia característica da estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup>, do mutante defectivo para a produção de bacteriocina e de seu transportador foram inoculadas em 5 ml de meio líquido DYGS e incubadas a 30°C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Após o crescimento, esses pré-inóculos foram adicionados a erlenmeyers de 125 ml contendo meio DYGS a fim de se obter uma cultura de 10 ml com uma D.O. de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. A cada erlenmeyer contendo o inóculo, foram adicionadas diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 500  $\mu$ M). Após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a cultura líquida ficou sob agitação durante 60 minutos a 30°C e 200 rpm. Após esse período, três alíquotas de 100  $\mu$ l da suspensão celular foram inoculadas em pontos equidistantes em uma placa contendo o meio sólido DYGS e incubadas por 24 horas. Foram realizadas três repetições por tratamento. Paralelamente, retirou-se uma colônia característica da estirpe de ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*, a qual foi inoculada em 5 ml de meio DYGS e incubada por 24 horas, a 30°C e sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de incubação, esse inóculo foi utilizado para formar a sobrecamada sobre as alíquotas de *G. diazotrophicus* já incubadas anteriormente, como já descrito acima. Desse modo, 1 ml da cultura de *X. albilineans* foi adicionada a 4 ml de meio DYGS fundente semissólido e vertido sobre as placas já inoculadas previamente com *G. diazotrophicus*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. A análise de dados ocorreu de modo qualitativo, por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição. Para todos os testes foram utilizadas três placas por tratamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Obtenção das sequências de aminoácidos relacionados à bacteriocina e sua regulação

Com a anotação do genoma de *G. diazotrophicus*, foi possível a identificação de dois genes relacionados à síntese e transporte de bacteriocina no genoma de *G. diazotrophicus* PAL5<sup>T</sup> no banco de dados do NCBI. Um dos genes identificados (GDI\_0415) está anotado como a atividade biológica capaz de codificar uma bacteriocina denominada linocina M18. O segundo gene (GDI\_3499) está anotado como um transportador de bacteriocina. O gene que codifica a linocina M18 possui 825 pb e compreende as posições de 412339 a 413163 no genoma de *G. diazotrophicus*. A bacteriocina codificada pela ORF GDI\_0415 está caracterizada como uma linocina M18. Esta bacteriocina foi inicialmente isolada e purificada a partir da estirpe M18 da bactéria láctica *Brevibacterium linens* (VALDÉS-STAUBER e SCHERER, 1994) e mostrou efeito antagônico contra várias estirpes de bactérias do gênero *Listeria*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus*. A bactéria *B. linens* é gram-positiva, encontrada em diversos habitats e pertence ao grupo dos actinomicetos. É utilizada no processamento de queijos do tipo Limburger e similares, contribuindo para a coloração, aroma e sabor do produto final (JOLLIVET et al., 1992). Segundo a classificação de Klaenhammer (KLAENHAMMER, 1993), para bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, a linocina M18 pertenceria ao grupo III ou IV. Valdés-Stauber e Scherer (1994) observaram que a linocina apresenta massa molecular de cerca de 31 kDa. A bacteriocina anotada para *G. diazotrophicus*, por análise da estrutura primária utilizando a ferramenta ProtParam do servidor ExPasy, apresentou uma massa molecular estimado em 29 kDa, muito semelhante à linocina acima. Os pontos isoeletrônicos também se mostraram semelhantes, sendo 4,5 para a bacteriocina oriunda de *B. linens* e 4,7 para a de *G. diazotrophicus*. Alguns artigos descrevem que essa proteína está relacionada com vesículas membranares. Sutter et al. (2008), utilizando a cristalografia de raio X, observaram que a linocina M18 de *Thermotoga marítima* pertenceria a uma família conservada que participa do encapsulamento de algumas enzimas. Esses autores sugerem que a linocina forma nanocompartimentos que contêm ferritinas ou peroxidases, as quais estão envolvidas em respostas aos estresses oxidativos (SUTTER et al., 2008). Ao contrário dos experimentos de Valdés-Stauber e Scherer (1994), Sutter et al. (2008) não observaram atividade antagônica em experimentos com a bacteriocina de *T. marítima*.

Análises *in silico* identificaram a ORF GDI\_0415 como supostamente um gene que codifica uma bacteriocina. A GDI\_0415 mostrou uma sequência de alta identidade, com bacteriocinas do tipo Linocina M18, bem estudada em *E. coli* (Figura 17). Essa alta identidade com bacteriocinas de outros gêneros da família *Acetobacteraceae* é explicada pela proximidade taxonômica entre as espécies. Porém, a presença dessas bacteriocinas em *Rhizobiales* e *Burkholderiales* pode indicar que a produção de bacteriocinas é um processo evolucionário bastante conservado e extremamente relacionado ao estilo de vida da bactéria, e pode estar associada a plantas.



**Figura 17:** Alinhamento da bacteriocina de *G. diazotrophicus* com os atribuídos com base em proteínas da mesma família em outras bactérias. O alinhamento múltiplo foi realizada utilizando ClustalW. Aminoácidos conservados são indicados em negrito.

	70	80	90	100	110	120
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 <sup>7</sup>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Rhizobium radiobacter</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Acidobacterium</i> sp. MP5ACTX8	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Escherichia coli</i> MS 146-1	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Methylocella silvestris</i> BL2	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia multivorans</i> 17616	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..

	130	140	150	160	170	180
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 <sup>7</sup>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Rhizobium radiobacter</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Acidobacterium</i> sp. MP5ACTX8	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Escherichia coli</i> MS 146-1	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Methylocella silvestris</i> BL2	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia multivorans</i> 17616	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..

	190	200	210	220	230	240
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 <sup>7</sup>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Rhizobium radiobacter</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Acidobacterium</i> sp. MP5ACTX8	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Escherichia coli</i> MS 146-1	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Methylocella silvestris</i> BL2	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia multivorans</i> 17616	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..	... ..

	250	260	270
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 <sup>7</sup>	... ..	... ..	... ..
<i>Rhizobium radiobacter</i>	... ..	... ..	... ..
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	... ..	... ..	... ..
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	... ..	... ..	... ..
<i>Acidobacterium</i> sp. MP5ACTX8	... ..	... ..	... ..
<i>Escherichia coli</i> MS 146-1	... ..	... ..	... ..
<i>Methylocella silvestris</i> BL2	... ..	... ..	... ..
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	... ..	... ..	... ..
<i>Burkholderia multivorans</i> 17616	... ..	... ..	... ..

**Figura 17:** Alinhamento da bacteriocina de *G. diazotrophicus* com os atribuídos com base em proteínas da mesma família em outras bactérias. O alinhamento múltiplo foi realizada utilizando ClustalW. Aminoácidos conservados são indicados em negrito (continuação).

O gene que codifica um possível transportador de bacteriocina (GDI\_3499) possui 2.226 pb e compreende as posições de 3596584 a 3598809 no genoma de *G. diazotrophicus*. Essa proteína pertence ao domínio de transportadores do tipo ABC, possuindo cerca de 80,7 kDa, segundo as análises do servidor ExPASy. Os transportadores ABC pertencem a uma grande família de proteínas responsáveis pela translocação de diversos compostos através da membrana, tanto em células procarióticas quanto eucarióticas (FATH e KOLTER, 1993).

A ORF GDI\_3499 mostrou uma sequência de alta identidade em seu domínio C-terminal. Essa alta identidade com proteínas transportadoras de bacteriocina de outros gêneros da família *Acetobacteraceae* (Figura 18) é explicada também pela proximidade taxonômica entre as espécies.

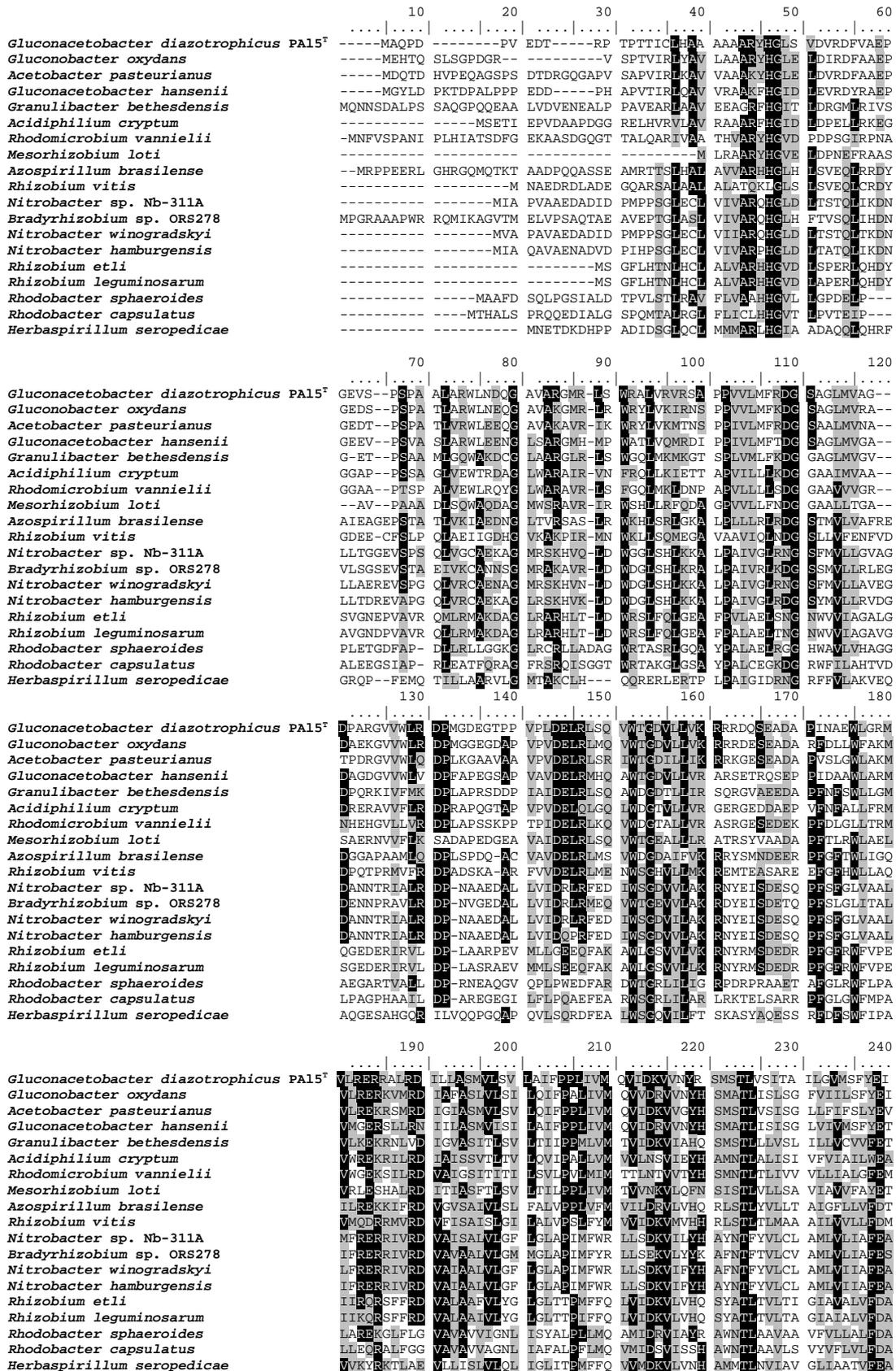


Figura 18: Alinhamento do transportador de bacteriocina de *G. diazotrophicus* com os atribuídos com base em proteínas da mesma família em outras bactérias. O alinhamento múltiplo foi realizada utilizando ClustalW. Aminoácidos conservados são indicados em negrito.

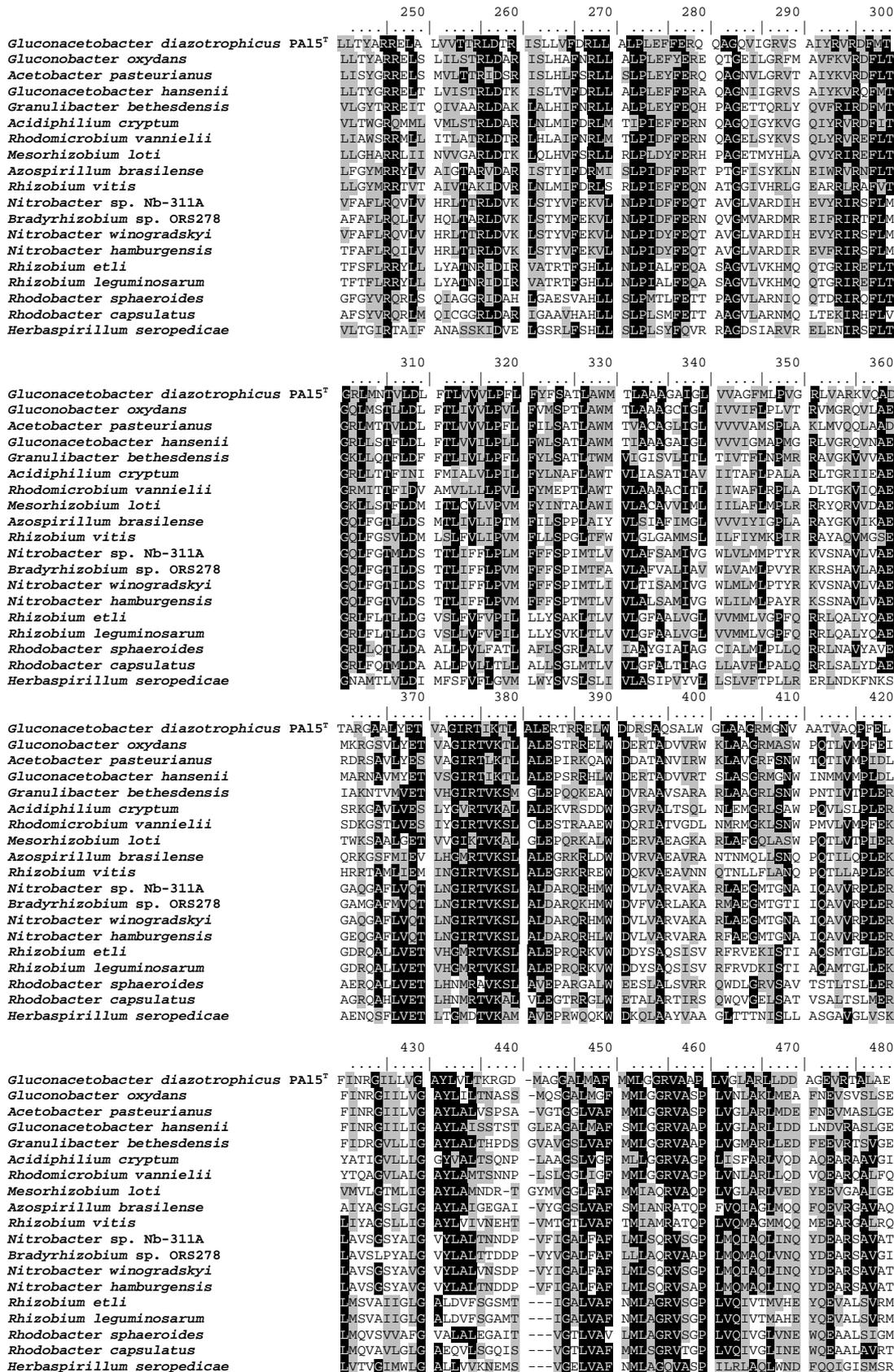


Figura 18: Alinhamento do transportador de bacteriocina de *G. diazotrophicus* com os atribuídos com base em proteínas da mesma família em outras bactérias. O alinhamento múltiplo foi realizada utilizando ClustalW. Aminoácidos conservados são indicados em negrito (continuação).

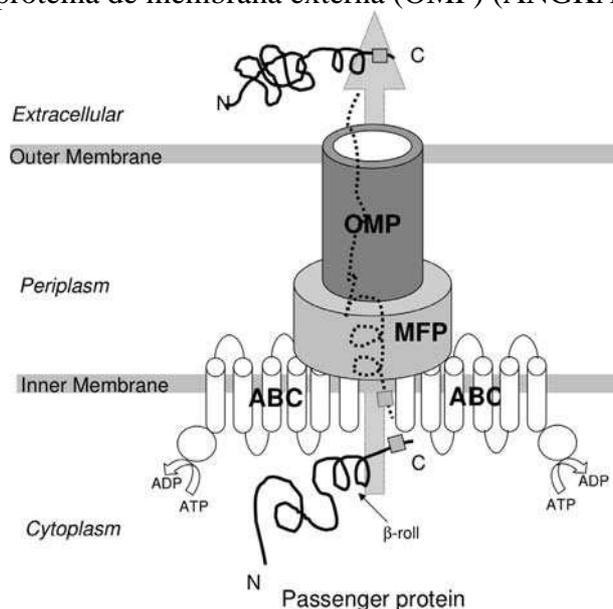
	490	500	510	520	530	540
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA15 <sup>†</sup>	AGT <sup>†</sup> VLNQPT	RLAMTTG <sup>†</sup> LRP	RIRGALS <sup>†</sup> FAD	VSESY <sup>†</sup> EGATT	RALAD <sup>†</sup> VSEFV	PAGSML <sup>†</sup> GLGV
<i>Gluconobacter oxydans</i>	AGMVENQ <sup>†</sup> TE	TKALTTG <sup>†</sup> MRP	VTKGALS <sup>†</sup> FNH	VDFEY <sup>†</sup> EGSTA	KALND <sup>†</sup> VDFHT	PAGT <sup>†</sup> MLGIVG
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AASVLEN <sup>†</sup> QTE	TRALTTG <sup>†</sup> MRP	RIRGALS <sup>†</sup> FED	VNFSEY <sup>†</sup> EGSTR	LALKSVN <sup>†</sup> PSV	PAGT <sup>†</sup> MLGIVG
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	AGSVLEN <sup>†</sup> QTE	TQALTTG <sup>†</sup> MRP	PIRGALS <sup>†</sup> FSD	VQFTY <sup>†</sup> EGAST	PALSD <sup>†</sup> VTFNV	PAGT <sup>†</sup> MLGIVG
<i>Granulibacter thesedensis</i>	VGAVLNQ <sup>†</sup> TE	SNALQNG <sup>†</sup> LRP	KFAGALS <sup>†</sup> FDN	VQFTY <sup>†</sup> EGSKT	PALCC <sup>†</sup> GVTFV	PAGT <sup>†</sup> MLGIVG
<i>Acidiphilium cryptum</i>	VGEVLN <sup>†</sup> RRPTE	RRAMNTG <sup>†</sup> LRP	AFRGA <sup>†</sup> VAFEE	VTFY <sup>†</sup> EGGKT	PALNK <sup>†</sup> VSPSI	PBG <sup>†</sup> TMLGIVG
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	VGVWLN <sup>†</sup> RRPTE	KRALTHG <sup>†</sup> LRP	KLBGALS <sup>†</sup> FDE	VTFRY <sup>†</sup> EGSKS	PALDN <sup>†</sup> ISRAI	EPG <sup>†</sup> MLGIVG
<i>Mesorhizobium loti</i>	AASVLEN <sup>†</sup> QTE	SSSNSTG <sup>†</sup> LRP	RLVGE <sup>†</sup> VVFS	LTFSY <sup>†</sup> IATKI	PALDR <sup>†</sup> VSEFI	PAGSM <sup>†</sup> FGIVG
<i>Azospirillum brasilense</i>	VASVLNQ <sup>†</sup> TE	QTLGRQ <sup>†</sup> GVFP	EIKCD <sup>†</sup> ITFSE	VTFRY <sup>†</sup> EGSQS	PALDD <sup>†</sup> IGFST	QAGQ <sup>†</sup> VIGIMG
<i>Rhizobium vitis</i>	VASVLNQ <sup>†</sup> TE	PRR-EHG <sup>†</sup> VRE	EFSGR <sup>†</sup> ISFED	VRFAY <sup>†</sup> ACTAV	PALNAIN <sup>†</sup> FHV	KFCN <sup>†</sup> LVLMG
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	VRKLVN <sup>†</sup> QPAE	EGRSGH <sup>†</sup> GVRS	PIDCK <sup>†</sup> VEFS	VTFRY <sup>†</sup> KGAVS	SSLNG <sup>†</sup> VSEFV	TPG <sup>†</sup> TTLGIVG
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	VGKLVN <sup>†</sup> QPAE	EGRSGH <sup>†</sup> GVRV	PLKGL <sup>†</sup> VEFS	VTFRY <sup>†</sup> KGAVS	PALNN <sup>†</sup> ISFEI	PLG <sup>†</sup> AKLGMV
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	VSKLVN <sup>†</sup> QPAE	EGRSGH <sup>†</sup> GVRS	PIDCK <sup>†</sup> VEFS	VTFRY <sup>†</sup> KGAVS	PSLNG <sup>†</sup> ISFEA	TPG <sup>†</sup> CATLGMV
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	VRNLVN <sup>†</sup> QPAE	EGRSGH <sup>†</sup> GVRS	PIDCK <sup>†</sup> VEFS	VTFRY <sup>†</sup> KGAVS	PILNG <sup>†</sup> ISFEV	TRG <sup>†</sup> TTLGMV
<i>Rhizobium etli</i>	LGEIMN <sup>†</sup> QPE	QAGRGR <sup>†</sup> GVFP	HLHGR <sup>†</sup> IEFDR	VTFRY <sup>†</sup> APDTA	PALDN <sup>†</sup> VSPAT	PAGS <sup>†</sup> VFGIVG
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	LGEIMN <sup>†</sup> QPE	QAGRGR <sup>†</sup> GVFP	HLQGR <sup>†</sup> IEFDR	VSEFR <sup>†</sup> YSPDSA	PALDN <sup>†</sup> VSEAV	PAGC <sup>†</sup> VFGIVG
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	LRRIMD <sup>†</sup> HPPE	RPDTA <sup>†</sup> ALARP	ALTCAL <sup>†</sup> EIRG	VSEFAY <sup>†</sup> EGAAE	PALDQ <sup>†</sup> VSEAI	EPGQ <sup>†</sup> VIGIVG
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	LRGVMD <sup>†</sup> HPPE	RGFEV <sup>†</sup> RPTRP	PLRGA <sup>†</sup> IRIED	LCFTY <sup>†</sup> EGTAT	PALDHL <sup>†</sup> TDI	AGAQ <sup>†</sup> VIGIVG
<i>Herbaspirillum seropedicace</i>	LADVLD <sup>†</sup> ARTE	VAGNR <sup>†</sup> TRL	RVNGA <sup>†</sup> ISFDL	VSEFR <sup>†</sup> YRPETP	EVIRGL <sup>†</sup> SLQI	RRGE <sup>†</sup> VIGIVG
	550	560	570	580	590	600
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA15 <sup>†</sup>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> VRSY	TCYLR <sup>†</sup> LDGVD	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIRDN
<i>Gluconobacter oxydans</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> VSRNY	TCYLR <sup>†</sup> LDGVD	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIRDN
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> VRSY	TCYLR <sup>†</sup> LDGVD	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIRDN
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> VRSY	TCYLR <sup>†</sup> LDGVD	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIRDN
<i>Granulibacter thesedensis</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> INRDY	EGYVK <sup>†</sup> LDGSD	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIREN
<i>Acidiphilium cryptum</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> INRDY	LCAVK <sup>†</sup> LDNTE	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> SVIRDN
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> INPEY	SCAUK <sup>†</sup> LDGLE	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> SVIRDN
<i>Mesorhizobium loti</i>	RSGSGK <sup>†</sup> STIT	RLLOQ <sup>†</sup> INRDY	SGFLK <sup>†</sup> LDGVD	LREIN <sup>†</sup> LHHLR	RSFG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> SVIRDN
<i>Azospirillum brasilense</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTVT	RLLOQ <sup>†</sup> LHONY	ECLVK <sup>†</sup> LDGVD	LREIDL <sup>†</sup> SHLR	SNLQ <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIREN
<i>Rhizobium vitis</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTVT	RLLOQ <sup>†</sup> LHQSY	SGLTR <sup>†</sup> LDGVE	LREVDL <sup>†</sup> VHLR	TNVG <sup>†</sup> VVLQES	FLFRG <sup>†</sup> TIRDN
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> LHSDY	DGLIK <sup>†</sup> LDGHD	VREYD <sup>†</sup> VDLHLR	RNVG <sup>†</sup> IVLQEN	FLFRG <sup>†</sup> STIREN
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> LHSDY	DGLIK <sup>†</sup> LDGHD	VREYD <sup>†</sup> VDLHLR	RNVG <sup>†</sup> VVLQEN	FLFRG <sup>†</sup> STIREN
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> LHSDY	DGLIK <sup>†</sup> LDGHD	VREYD <sup>†</sup> IDHLR	RNVG <sup>†</sup> IVLQEN	FLFRG <sup>†</sup> STIREN
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> LHSDY	DGLIK <sup>†</sup> LDGVD	VREYD <sup>†</sup> VDLHLR	RNVG <sup>†</sup> IVLQEN	FLFRG <sup>†</sup> STIREN
<i>Rhizobium etli</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> LYSQ	EGLVR <sup>†</sup> MDGYD	SREIDL <sup>†</sup> VHLR	TSIG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIRDN
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> LYSQ	EGLVR <sup>†</sup> MDGYD	SREIDL <sup>†</sup> VHLR	TSIG <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> SVIRDN
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> ETFP	AGLLP <sup>†</sup> FDGHD	IRSLA <sup>†</sup> LGPLR	ROVQ <sup>†</sup> VVLQDN	FLFRG <sup>†</sup> TIREN
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TTIT	RLLOQ <sup>†</sup> IGSAQ	SCRIL <sup>†</sup> YDQND	ARRH <sup>†</sup> LDLHLR	RSVQ <sup>†</sup> IVLQEN	FLFRG <sup>†</sup> TIREN
<i>Herbaspirillum seropedicace</i>	RSGSGK <sup>†</sup> TLA	KLW <sup>†</sup> QRYLYCE	TCRIS <sup>†</sup> VDCGD	TALIT <sup>†</sup> DTASLR	QQIG <sup>†</sup> VVLQEN	TLFRS <sup>†</sup> SIRDN
	610	620	630	640	650	660
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA15 <sup>†</sup>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	EDV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIC
<i>Gluconobacter oxydans</i>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	DDA <sup>†</sup> TAAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARAVIS
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	DDV <sup>†</sup> VHAAARMA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARAVIT
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	EAV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARAVIT
<i>Granulibacter thesedensis</i>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	EDV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIS
<i>Acidiphilium cryptum</i>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	EDA <sup>†</sup> TAAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIA
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	ITACR <sup>†</sup> PGLSF	EDAV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIA
<i>Mesorhizobium loti</i>	ITACR <sup>†</sup> PGTIT	SDA <sup>†</sup> MRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIH
<i>Azospirillum brasilense</i>	ITAA <sup>†</sup> NRSPASL	EEV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIV
<i>Rhizobium vitis</i>	ITIA <sup>†</sup> RPDASP	EEI <sup>†</sup> MEVARVA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIV
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	ITSA <sup>†</sup> APDADF	DDV <sup>†</sup> VKAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIV
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	ITSA <sup>†</sup> APDADF	DEI <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIV
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	ITCA <sup>†</sup> APDADF	DDV <sup>†</sup> VKAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIV
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	ITCA <sup>†</sup> APDADF	DDV <sup>†</sup> VKAARMA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIV
<i>Rhizobium etli</i>	ITAA <sup>†</sup> NRPDASI	EEI <sup>†</sup> MEVARVA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIT
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ITAA <sup>†</sup> NRPDASI	EEI <sup>†</sup> MEVARVA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIT
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ITALAR <sup>†</sup> PBAGL	EAV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIT
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	ITALAR <sup>†</sup> PDASH	EAV <sup>†</sup> VRAARLA	GAE <sup>†</sup> EFTIRMP	AGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SNL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIA
<i>Herbaspirillum seropedicace</i>	ITALAR <sup>†</sup> DPSTPI	EQI <sup>†</sup> IAARLA	GAH <sup>†</sup> DFICELP	EGY <sup>†</sup> ETWIEEG	SGSL <sup>†</sup> SGGQRO	RLA <sup>†</sup> IARALIT
	670	680	690	700	710	720
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA15 <sup>†</sup>	DPRL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRVA
<i>Gluconobacter oxydans</i>	DPKLM <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VNCHQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRIV
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DPKLM <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VNCHQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRVA
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	DPRL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Granulibacter thesedensis</i>	DPRL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRVE
<i>Acidiphilium cryptum</i>	DPRL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	DPKLM <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Mesorhizobium loti</i>	DPRL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Azospirillum brasilense</i>	DPSV <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Rhizobium vitis</i>	NPPI <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	DPPI <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	NPPI <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	DPPI <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	DPPI <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Rhizobium etli</i>	DPKLM <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	DPKLM <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	DPRL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	DPPI <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV
<i>Herbaspirillum seropedicace</i>	NPGL <sup>†</sup> LILDEA	TSALD <sup>†</sup> PESEA	LVNAN <sup>†</sup> LQRIA	RGRTM <sup>†</sup> VIVSH	RLSSL <sup>†</sup> VDCDQ	ILVMD <sup>†</sup> QGRV

**Figura 18:** Alinhamento do transportador de bacteriocina de *G. diazotrophicus* com os atribuídos com base em proteínas da mesma família em outras bactérias. O alinhamento múltiplo foi realizada utilizando ClustalW. Aminoácidos conservados são indicados em negro (continuação).

	730	740	750	760
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 <sup>7</sup>	DIGP <b>H</b> AAL <b>L</b> D	RCA-TYR <b>L</b> W	FQONR <b>H</b> EAR-	GREPA <b>H</b> PAAM
<i>Gluconobacter oxydans</i>	DIAP <b>H</b> SV <b>L</b> LE	RCE-TYR <b>L</b> W	LQONR <b>H</b> MT--	DNDG <b>P</b> GSAGQ
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DIAP <b>H</b> DV <b>L</b> LE	RCD-TYR <b>L</b> W	MQONR <b>H</b> TE--	GRASSAGASL
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	DIAP <b>H</b> AV <b>L</b> LR	RCE-TYR <b>L</b> W	QQONR <b>H</b> OS--	SPPAASGEDM
<i>Granulibacter thesedensis</i>	DMAP <b>H</b> KV <b>L</b> LE	RCT-TYR <b>L</b> W	NQONR <b>H</b> MEA-	AQKQ <b>P</b> VASM
<i>Acidiphilium cryptum</i>	DIGR <b>H</b> AD <b>L</b> VE	RCA-TYR <b>L</b> W	LQONR <b>H</b> MNPE	GGRH-APTPT
<i>Rhodomicrobium vanniellii</i>	DIGP <b>H</b> RE <b>L</b> VE	RCA-TYR <b>L</b> W	LQONR <b>H</b> SDYQ	GKVHAA <b>P</b> APS
<i>Mesorhizobium loti</i>	DVAP <b>H</b> AT <b>L</b> LE	RCA-TYR <b>L</b> W	SQONR <b>H</b> LDG-	RHGR-PVAVP
<i>Azospirillum brasilense</i>	DMG <b>K</b> ED <b>L</b> LO	RCD-TYR <b>L</b> W	FQONR <b>H</b> LSPG	STHDRAP <b>L</b> TP
<i>Rhizobium vitis</i>	DSGT <b>H</b> DL <b>L</b> LR	RSG-TYR <b>L</b> W	NQONR <b>H</b> ITTG	KDHDE <b>N</b> -LDA
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	DIGR <b>H</b> EB <b>L</b> LA	RND-TYR <b>L</b> W	YQON <b>T</b> H <b>L</b> APA	VRSD <b>K</b> PKLRS
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	DIGR <b>H</b> EB <b>L</b> LE	RND-TYR <b>L</b> W	HQON <b>S</b> H <b>L</b> IAA	PKRSR <b>P</b> GYGG
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	DIGR <b>H</b> EB <b>L</b> LA	RND-TYR <b>L</b> W	YQON <b>T</b> H <b>L</b> APA	VRND <b>K</b> PKLRS
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	DIGR <b>H</b> EB <b>L</b> LE	RND-TYR <b>L</b> W	YQON <b>T</b> H <b>L</b> APA	VRSD <b>K</b> PKLRS
<i>Rhizobium etli</i>	DIGR <b>H</b> D <b>L</b> VA	RCM-TYR <b>L</b> W	AQOM <b>R</b> OVA--	-----
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	DIGR <b>H</b> D <b>L</b> VS	RCM-TYR <b>L</b> W	AQOM <b>R</b> OVA--	-----
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AFAP <b>H</b> EA <b>L</b> LA	GCE-TYR <b>L</b> W	ROO <b>T</b> E <b>H</b> LS--	-----
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	DFAP <b>H</b> EA <b>L</b> LA	RSP-TYR <b>L</b> W	LOO <b>A</b> GOTE--	-----
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	ESGS <b>H</b> ED <b>L</b> LD	LPGGT <b>L</b> Y <b>A</b> HLW	RLQAG <b>H</b> AGLI	EERTA-----

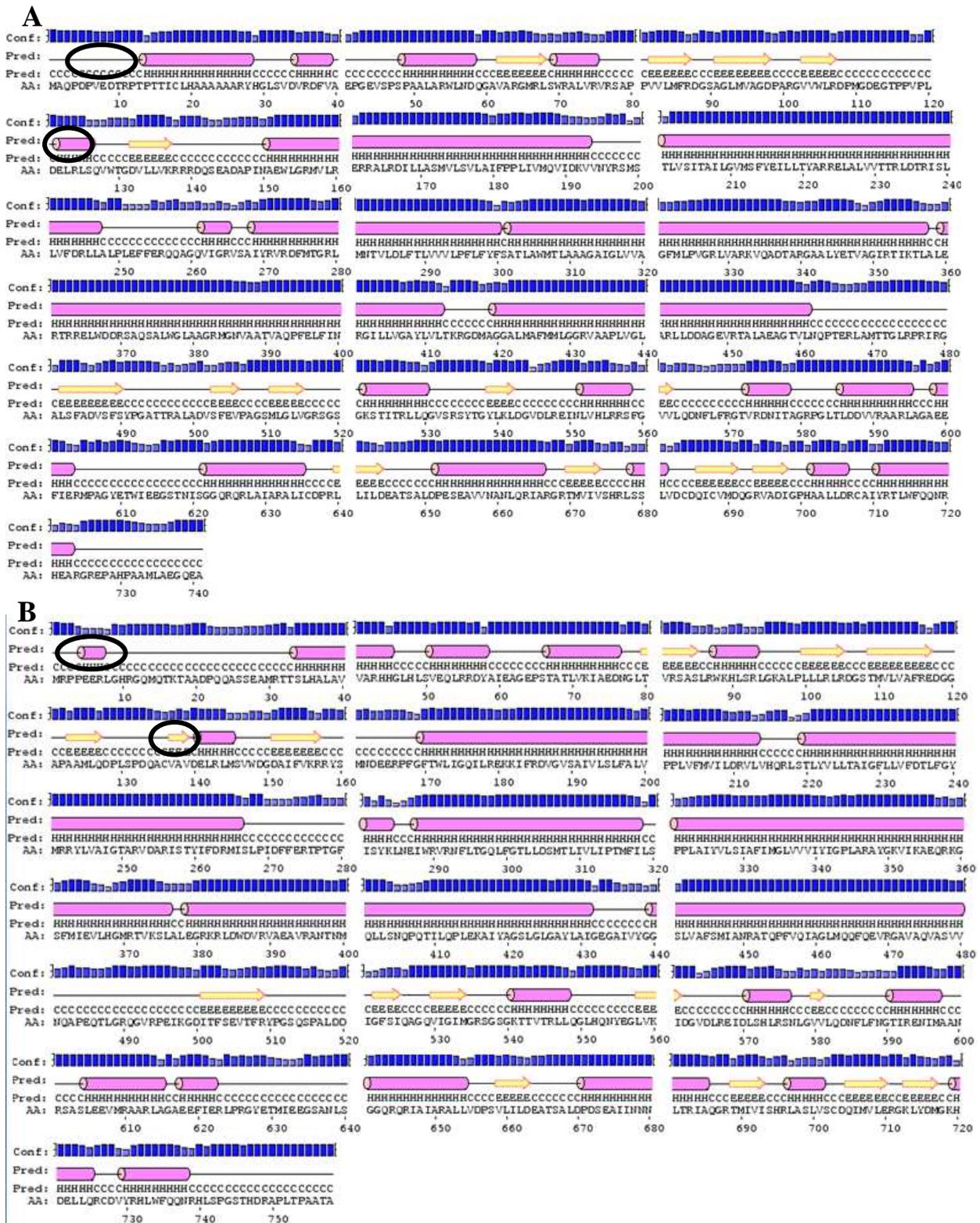
**Figura 18:** Alinhamento do transportador de bacteriocina de *G. diazotrophicus* com os atribuídos com base em proteínas da mesma família em outras bactérias. O alinhamento múltiplo foi realizada utilizando ClustalW. Aminoácidos conservados são indicados em negrito (continuação).

Os transportadores ABC em bactérias Gram-negativas compreendem geralmente dois domínios membranares de características hidrofóbicas e dois domínios hidrofílicos conservados que se ligam a moléculas de ATP (BINET et al., 1997). No entanto, a maioria dos sistemas de transporte ABC em bactérias Gram-negativas envolve geralmente duas proteínas acessórias. Uma delas é uma proteína de membrana com um domínio hidrofóbico N-terminal ancorado na membrana interna, com um grande domínio hidrofílico localizado no periplasma e um domínio C-terminal com uma possível estrutura de folha- $\beta$  pregueada que interage com a membrana externa (Figura 19). Devido à estrutura membrana, essa proteína acessória é classificada como pertencendo à família de proteínas de fusão de membrana (MFP) (DINH et al., 1994; ANGKAWIDJAJA et al., 2006). A segunda proteína acessória é uma proteína de membrana externa (OMP) (ANGKAWIDJAJA et al., 2006).



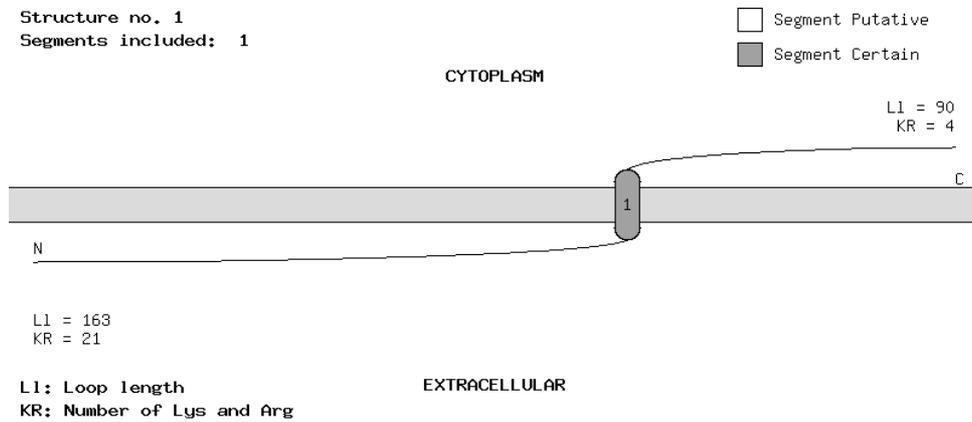
**Figura 19:** Sistema de secreção ABC. Onde MFP corresponde a proteína de fusão de membrana e OMP corresponde a proteína de membrana externa. (ANGKAWIDJAJA et al., 2006).





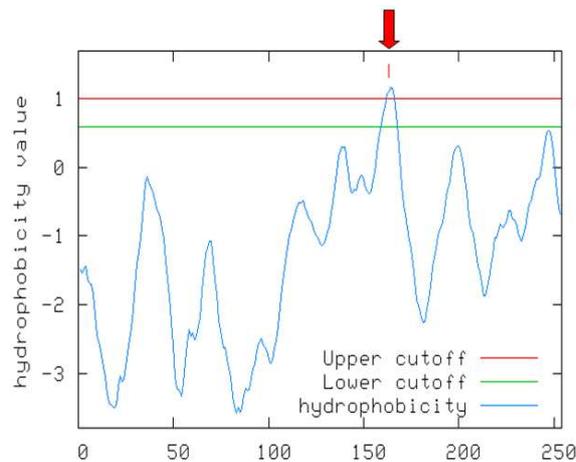
**Figura 21:** Predição da estrutura secundária do transportador de bacteriocina: *G. diazotrophicus* (A) e *Azospirillum brasilense* (B). A predição da estrutura secundária está sobre a sequência. Os cilindros representam  $\alpha$ -hélices e as setas representam as folhas  $\beta$  enquanto as alças estão representadas por um traço. Os círculos apontam as diferenças entre as duas predições.

Já para a predição das possíveis regiões transmembranares, utilizou-se o programa TOPPRED 2 (VON HEIJNE, 1992). Ele indicou uma provável região transmembrânica compreendida entre os resíduos 164-184 para a bacteriocina traduzida pela ORF GDI\_0415 (Figura 22). Os resultados da análise físico-química dessa proteína apontaram que essa possível bacteriocina possui uma massa de 29,08 kDa com 274 aminoácidos, um ponto isoelétrico teórico de 4,77 e uma fórmula estrutural de  $C_{1297}H_{2029}N_{357}O_{402}S_1$ .



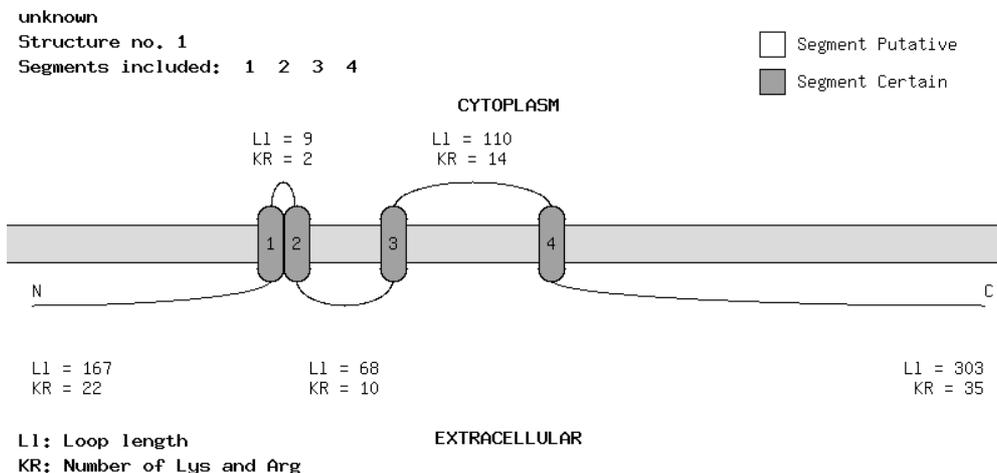
**Figura 22.** Topologia das prováveis regiões transmembrânicas da bacteriocina transcrita pela ORF GDI\_0415 de *G. diazotrophicus*. Figura gerada pelo programa TOPPRED.

A Figura 23 mostra o resultado do momento hidrofóbico em relação a cada um dos resíduos da sequência primária da bacteriocina.



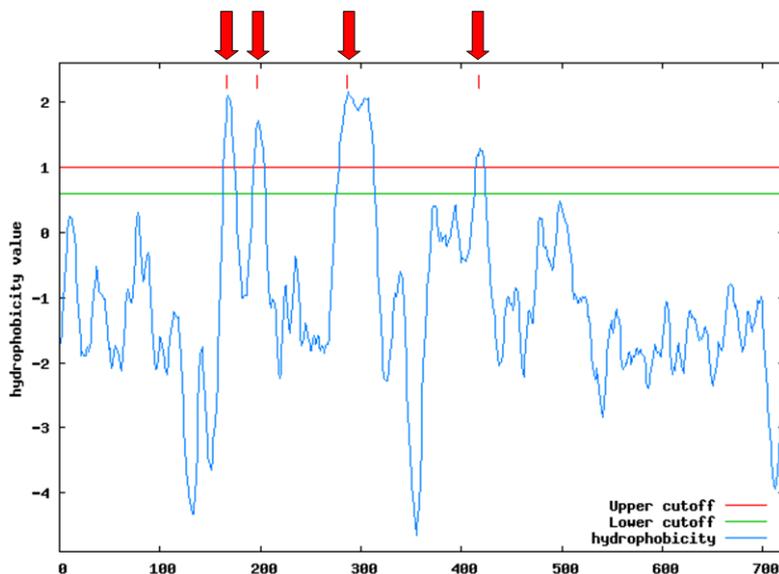
**Figura 23:** Momento hidrofóbico em relação aos resíduos da linocina M18 da *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Para a proteína transportadora de bacteriocina, quatro prováveis regiões transmembrânicas compreendidas entre os resíduos 166-186, 202-227, 304-324 e 385-410 (Figura 24). Os resultados físico-químicos revelaram uma massa de 80,76 kDa com 741 aminoácidos, um ponto isoelétrico teórico de 9,42 e uma fórmula estrutural de  $C_{3585}H_{5829}N_{1039}O_{1020}S_{30}$ .



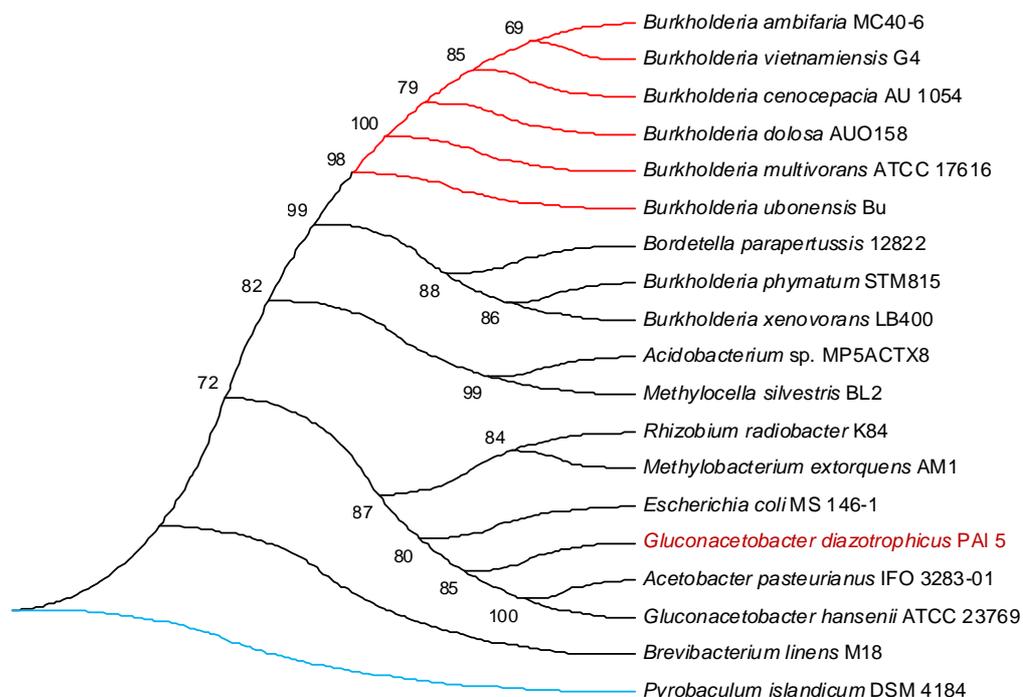
**Figura 24.** Topologia das prováveis regiões transmembrânicas do transportador de bacteriocina transcrita pela ORF GDI\_3499 de *G. diazotrophicus*. Figura gerada pelo programa TOPPRED.

A Figura 25 mostra o momento hidrofóbico em relação a cada um dos resíduos da sequência primária do transportador de bacteriocina.



**Figura 25:** Momento hidrofóbico em relação aos resíduos do transportador de bacteriocina da *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

A sequência de aminoácidos codificada pela ORF GDI\_0415 foi alinhada com 18 sequências de proteínas ortólogas, todas do filo das Proteobactérias. Uma análise pelo Pfam mostrou que as 19 sequências também possuem domínios para bacteriocinas. A árvore filogenética (Figura 26) foi dividida em dois grandes ramos: um composto por bactérias da família das *Burkholderiaceae*, que possuem uma ampla distribuição, ocorrendo comumente no solo, água, plantas, fungos, animais e humanos (DANCE, 2000; ZANETTI et al., 2000; SALES et al., 2004; REIS et al., 2004; PARTIDA-MARTINEZ e HERTWECK, 2007) e o outro, composto por bactérias do grupo das alfa- proteobactérias.



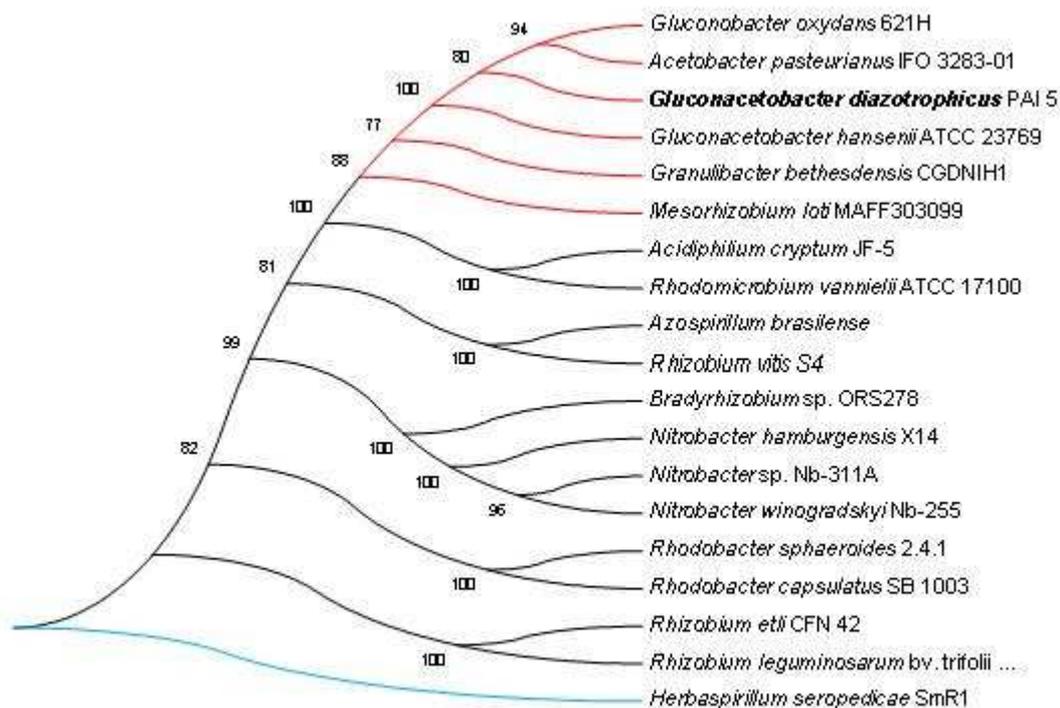
**Figura 26:** Árvore filogenética dos genes que codificam a bacteriocina linocina m18 dos organismos analisados, calculada pelo método *Neighbor-Joining*, fornecida pelo MEGA 4.0

A árvore filogenética da Figura 27 mostra que a bacteriocina de *G. diazotrophicus* está muito próxima da bacteriocina de *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconacetobacter hansenii* ambas da mesma família. Curiosamente esse gene também possui semelhanças com o gene para síntese de bacteriocinas de *E. coli* MS 146-1 (68% de identidade, com *e-value* de  $6e^{-102}$ ), que é uma  $\chi$ -proteobacteria, evolutivamente muito distante de *G. diazotrophicus*. Porém, essa proteína está presente apenas nesta estirpe de *E. coli*. A bacteriocina codificada pela ORF 0415 de *G. diazotrophicus* é uma proteína altamente conservada em duas espécies da família *Acetobacteraceae* com genomas sequenciados: *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconacetobacter hansenii*. É, porém, ausente em outras, como: *Acidiphilium cryptum*, *Granulibacter bethesdensis*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti* e *Acidiphilium multivorum* (BERTALAN et al., 2009). Esse aspecto é surpreendente, pois, mesmo com algumas sequências de genomas bacterianos anotados e disponíveis de membros da família *Acetobacteraceae*, a presença de genes homólogos a bacteriocinas teria que estar restrita a todos os membros dessa família. Na verdade, vários genes homólogos a esse gene foram encontrados em outras espécies evolutivamente muito distantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e que não compartilham o mesmo hábitat. Em relação a esse último aspecto, vale ressaltar que essa ORF está localizada em uma ilha genômica segundo Bertalan et al. (2009), o que provavelmente pode ter sido adquirida por transferência

horizontal de genes, levando essa parte do genoma provavelmente a contribuir para a adaptação da bactéria ao habitat na planta hospedeira.

Análises por PCRs realizados por Bertalan et al. (2009), utilizando oligonucleotídeos específicos para ORF GDI\_0415, revelaram que existem homólogos dessa ORF nas diferentes estirpes de *G. diazotrophicus*, inclusive em outra espécie de *Gluconacetobacter* associada à planta (*G. johannae*). Esse dado pode indicar a importância da bacteriocina para a adaptação ao estilo de vida bacteriano endofítico, o que pode conferir vantagens adaptativas à *G. diazotrophicus* em comparação com outros microrganismos que colonizam o mesmo nicho.

A sequência de aminoácidos codificada pela ORF GDI\_3499 foi alinhada com 18 sequências de proteínas ortólogas com *e-value*  $<10^{-35}$ , todas do filo das Proteobactérias. Uma análise pelo Pfam mostrou que as 19 sequências possuem domínios para transportadores de bacteriocinas. A árvore filogenética foi dividida em seis grandes ramos (Figura 27). Esses ramos são compostos por bactérias do grupo das  $\alpha$ - proteobactérias, que se associam com plantas. A árvore filogenética também ilustra que o transportador para bacteriocina de *G. diazotrophicus* está muito próxima ao de *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans*, ambas da mesma família. Este gene também possui semelhanças com o gene para transporte de bacteriocinas de *Herbaspirillum seropedicae*, que é uma  $\beta$ -proteobactéria, evolutivamente mais distante de *G. diazotrophicus*, mas compartilhando o mesmo habitat associado a plantas.

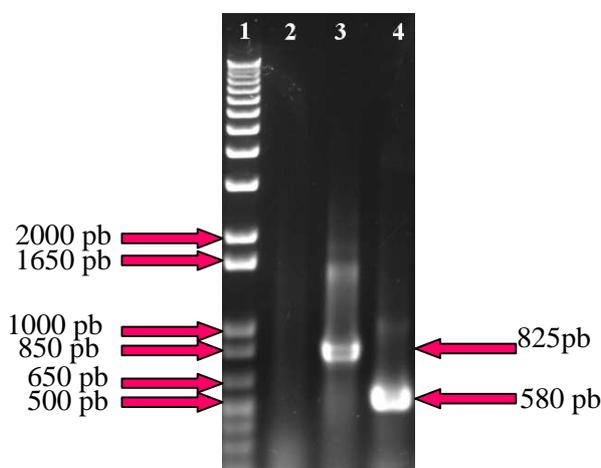


**Figura 27:** Árvore filogenética dos genes que codificam o transportador de bacteriocina dos organismos analisados, calculada pelo método Neighbor-Joining, fornecido pelo MEGA 4.0

### 3. Construção dos mutantes sítio-dirigidos para bacteriocina e seu transportador

#### 3.1 Amplificação dos fragmentos selecionados

A amplificação dos genes de interesse mostrou-se eficiente para ambas as ORFs selecionadas (Figura 28).

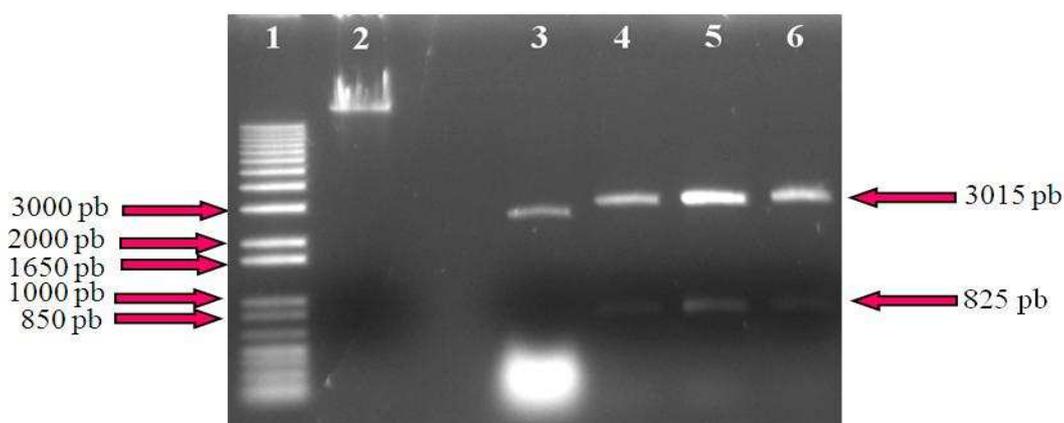


**Figura 28:** Visualização das ORFs GDI\_0415 que codifica a bacteriocina da família Linocina M18 e GDI\_3499 que codifica um transportador de bacteriocina. Linhas 1: Padrão de massa molecular 1kb Plus DNA ladder; Linha 2: Controle negativo; Linhas 3 e 4: Produtos da amplificação de 850 e 580 pb das ORFs GDI\_0415 e GDI\_3499 de *G. diazotrophicus*.

Pela incorporação do marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder foi possível verificar que o tamanho do fragmento amplificado está aproximadamente na região dos 800 pb para a ORF de GDI\_0415 e abaixo de 600 pb para a ORF de GDI\_3499. Esses resultados confirmam o tamanho obtido previsto por meio do software pDRAW32.

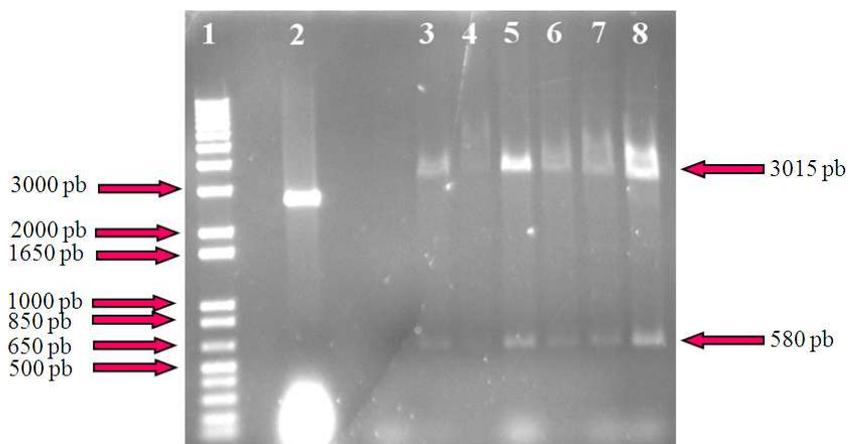
#### 3.2 Verificação da presença dos fragmentos clonados no plasmídeo pGEM-T Easy na estirpe DH10B de *E.coli*

A verificação da clonagem dos fragmentos na estirpe DH10B foi realizada por meio de análises de restrição com a enzima *EcoRI*, após purificação do DNA plasmidial, conforme mostrado nas Figuras 29 e 30.



**Figura 29:** Visualização em gel de agarose dos fragmentos de bacteriocinas (GDI0415) clonados no plasmídeo pGEM-T Easy em células DH10B de *E.coli* (extração plasmidial). Linha 1: Padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA ladder; Linha 2: Padrão de massa molecular de 100 ng.μl<sup>-1</sup>; Linhas 3, 4, 5 e 6: Clones contendo a ORF GDI\_0415 digeridos com *EcoRI*.

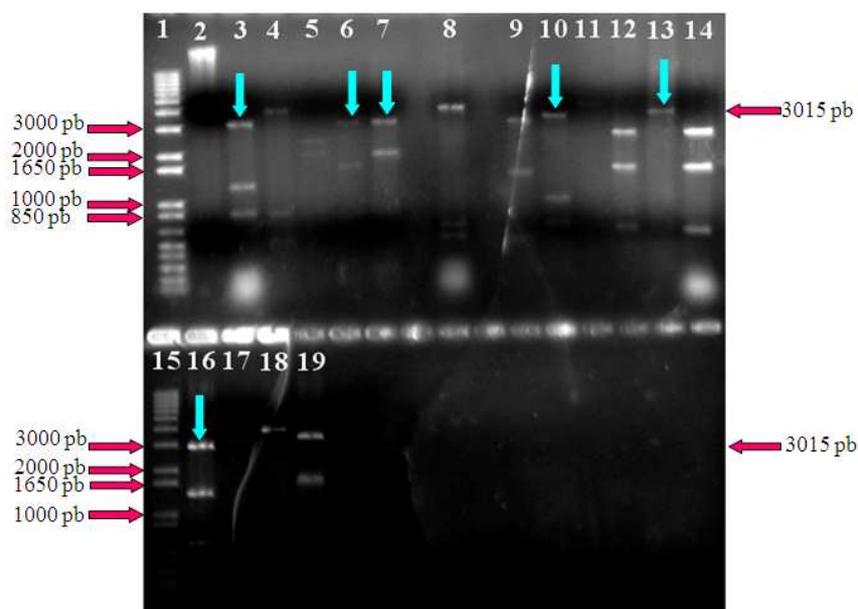
A partir dos resultados mostrados na Figura 29, pode-se constatar o sucesso da clonagem do gene que codifica a bacteriocina (GDI\_0415) nas colônias de DH10B por meio da presença do plasmídeo de maior peso molecular quando comparado com o plasmídeo sem o fragmento (controle). Como na Figura 29, a Figura 30 também revela a clonagem do fragmento que codifica o transportador para bacteriocina (GDI\_3499). Da mesma forma que o observado para o gene da bacteriocina, foi confirmada a presença nas colônias de DH10B de plasmídeo de maior peso molecular em relação ao plasmídeo sem o fragmento (controle).



**Figura 30:** Visualização em gel de agarose dos fragmentos do transportador de bacteriocina (GDI3499) clonados no plasmídeo pGEM-T Easy em células DH10B de *E.coli* (extração plasmidial). Linha 1: Padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA ladder; Linha 2: Vetor pGEMT easy vazio; Linhas 3, 4, 5, 6, 7 e 8: Clones contendo a ORF GDI\_3499 digeridos com *EcoRI*.

### 3.3 Verificação da inserção do transposon nos genes de interesse

Após a transposição *in vitro* do transposon Tn5 e clonagem das construções resultantes em DH10B, a verificação da inserção do transposon nos clones foi realizada por meio de digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* e visualizada pelo processo de eletroforese em gel de agarose. Os resultados apresentados na Figura 31 indicam o sucesso da mutação sítio-dirigida em algumas construções, uma vez que o transposon TN5 insere-se de forma aleatória no genoma plasmidial.

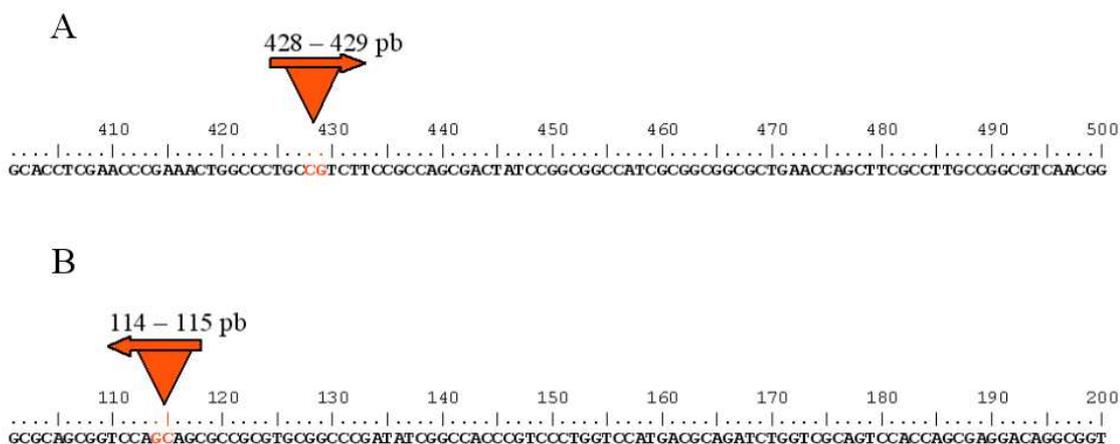


**Figura 31:** Visualização em gel de agarose da digestão dos fragmentos de bacteriocina (GDI\_0415) e do transportador de bacteriocina (GDI\_3499), os quais foram inseridos no transposon Tn5. Linha 1 e 15: Padrão de peso molecular 1kb Plus DNA ladder; Linha 2: Padrão de massa molecular de  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ; Linhas 3 a 7: DNA plasmidial de clones GDI\_0415+Tn5 clivados com a enzima *HindIII* e *EcoRI*. Linhas 8 a 19: DNA plasmidial de clones GDI\_3499+Tn5 clivados com a enzima *HindIII* e *EcoRI*. As setas indicam os perfis esperados.

Para a mutação sítio-dirigida da bacteriocina, a inserção do transposon nas ORFs de interesse se mostrou eficiente para as construções das linhas 3, 6 e 7 (Figura 31). Os eventos presentes nas linhas de número 4 e 5 mostram que o transposon TN5 não se inseriu no lugar correto para que a realização da mutação sítio-dirigida ocorresse de forma eficiente. Em relação à mutação sítio-dirigida para o transportador de bacteriocina, a inserção do transposon foi realizada com sucesso nos clones das linhas 9, 10, 13 e 16. Por outro lado, os eventos das linhas de número 8, 11, 12, 14, 17, 18 e 19 mostram que o transposon Tn5 não se inseriu no lugar correto para que a realização da mutação sítio-dirigida ocorresse de forma eficiente. Tais diferenças são devidos ao fato de que o transposon se insere de forma aleatória na construção.

### 3.4 Sítios de inserção do transposon Tn5

O sequenciamento dos insertos nos plasmídeos recombinantes com oligonucleotídios FP-1 ou RP-1, que se anelam na sequência conhecida do transposon e permitem a leitura do DNA que o flanqueia, permitiu determinar o sítio de inserção do elemento de transposição no gene. Os resultados apresentados na Figura 32 mostram que a inserção do elemento de transposição ocorreu a 429 pb após o início da sequência de GDI\_0415 e que o elemento de transposição se inseriu no mesmo sentido da ORF GDI\_0415 e a 115 pb após o início da sequência de GDI\_3499, porém de forma invertida ao sentido da ORF.

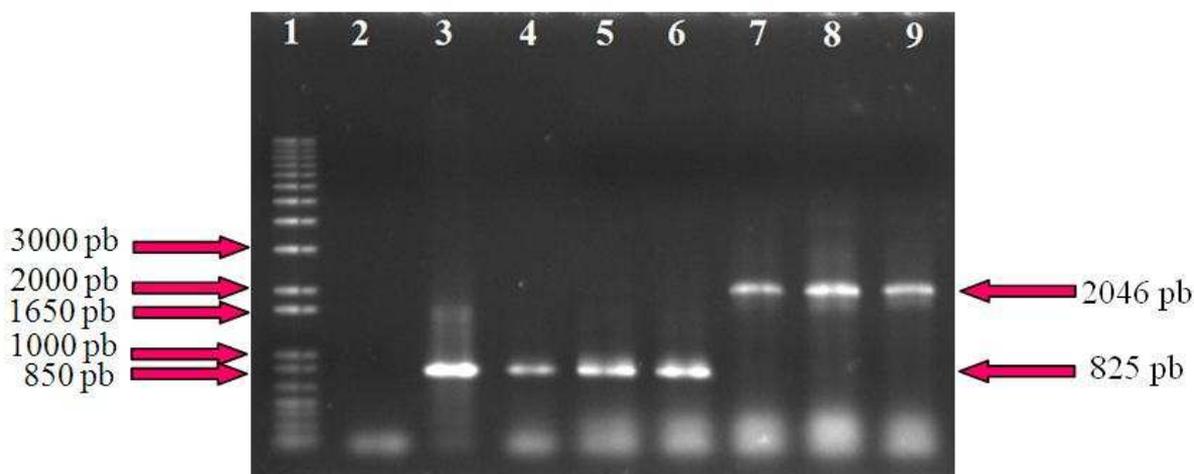


**Figura 32:** Representação do sítio de inserção do transposon Tn5 no genoma da estirpe mutante para ORF GDI\_0415 (A) e GDI\_3499 (B) a partir das reações de sequenciamento.

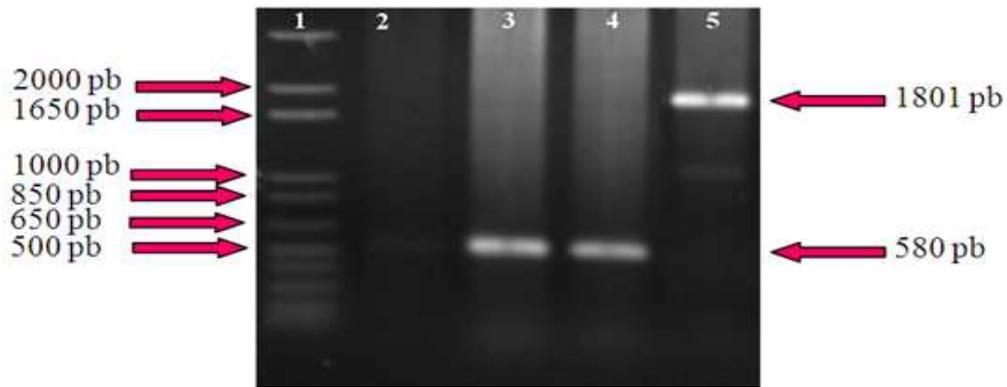
## 4. Caracterização molecular dos mutantes insercionais

### 4.1 PCR de colônia

Após a transferência dos plasmídeos recombinantes para as células de PAL5 e obtenção de colônias resistentes ao antibiótico canamicina na concentração de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , (prováveis mutantes das ORFs em estudo), as confirmações do sucesso do processo de mutagênese das ORFs GDI\_0415 e GDI\_3499 foram executadas por meio de PCR, utilizando-se iniciadores específicos para cada gene e ajustando-se o tempo de extensão dos iniciadores, como descrito em material e métodos. Como resultado das ampliações, foram obtidos produtos dos tamanhos esperados, ou seja, de aproximadamente 825 pb para ORF GDI\_0415 e de aproximadamente 2046 pb para o mutante GDI\_0415::Tn5 (Figura 33). Da mesma forma, foram observados fragmentos de cerca de 580 pb para ORF GDI\_3499 e de aproximadamente 1801 pb para o mutante GDI\_3499::Tn5 (Figura 34).



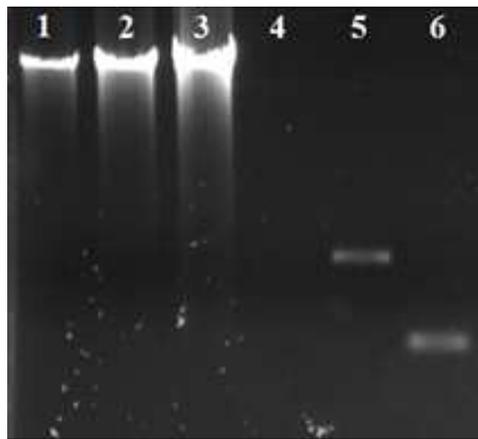
**Figura 33:** Perfis de amplificação por PCR de colônia da ORF GDI\_0415 em estirpes selvagem e mutante de *G. diazotrophicus*. Linha 1: Padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA ladder; Linha 2: Controle negativo da reação de PCR; Linhas 3 a 6: Produto da amplificação de 825 pb ORF GDI\_0415 da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup>; Linha 7 a 9: Produto da amplificação de aproximadamente 2046 pb para GDI\_0415::Tn5 da estirpe mutante.



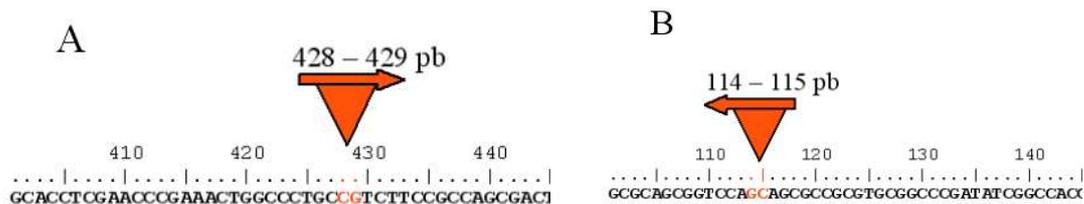
**Figura 34:** Perfis de amplificação por PCR de colônia da ORF GDI\_3499 em estirpes selvagem e mutante de *G. diazotrophicus*. Linha 1: Padrão de massa molecular 1 kb Plus DNA ladder; Linha 2: Controle negativo da reação de PCR; Linhas 3 e 4: Produto da amplificação de 580 pb ORF GDI\_3499 da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup>; Linha 5: Produto da amplificação de 1801 pb para GDI\_3499::Tn5 da estirpe mutante.

#### 4.2 PCR invertido (PCRi)

Reações de PCRi foram executadas utilizando como molde o DNA total das estirpes PAL5<sup>T</sup>, MUT GDI\_0415 e MUT GDI\_3499 previamente digeridos com a enzima de restrição *Pst*I (gel não apresentado) e ligado com a T4-DNA ligase para amplificar as sequências que flanqueiam o Tn5 (Figura 35). As bandas foram purificadas e sequenciadas para identificar o sítio de inserção do Tn5. A comparação das sequências obtidas no sequenciamento com as depositadas no NCBI (GenBank: AM889285) revelou que o elemento de transposição foi inserido no mesmo sentido de orientação do gene GDI\_0415, na posição de 428 pb do início do gene (Figura 36A) e que, para a outra mutação, o elemento de transposição foi inserido de forma invertida em relação à orientação do gene GDI\_3499, na posição de 114 pb do início do gene (Figura 36B).



**Figura 35:** Produtos gerados por PCR invertido, do material genômico previamente digerido com a enzima de restrição *Pst*I e ligado com T4-DNA ligase. Linhas 1, 2 e 3: Padrões de massa molecular correspondente a: 25, 50 e 100 ng.µl<sup>-1</sup>, respectivamente; Linha 4: Produto de PCR invertido gerado a partir do DNA genômico de PAL5<sup>T</sup> digerido com *Pst*I; Linha 5: Produto de PCR invertido gerado a partir do DNA genômico do mutante MUT GDI\_3499 digerido com *Pst*I; Linha 6: Produto de PCR invertido gerado a partir do DNA genômico do mutante MUT GDI\_0415 digerido com *Pst*I.



**Figura 36.** Representação do sítio de inserção do transposon Tn5 no genoma da estirpe mutante para a ORFs GDI\_0415 (A) e GDI\_3499 (B) a partir das reações de sequenciamento.

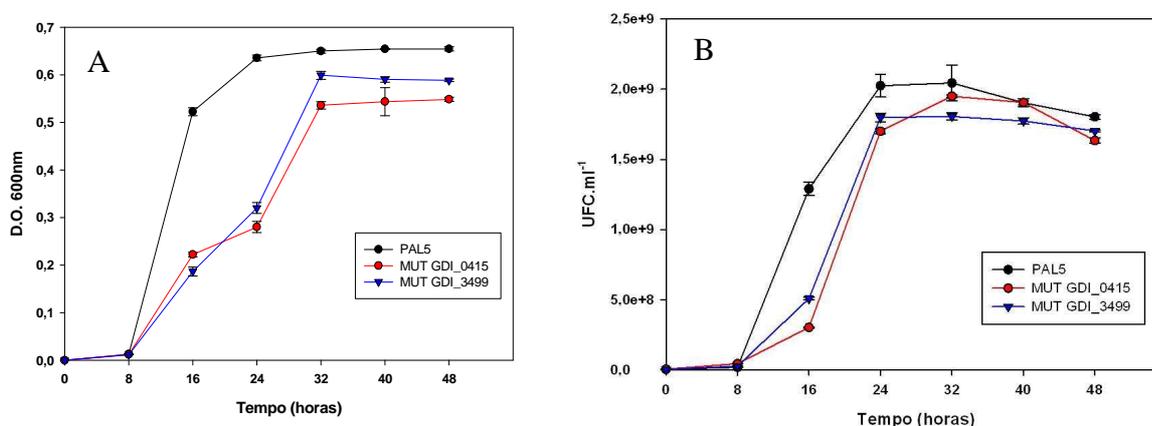
## 5. Caracterização fenotípica dos mutantes sítio-dirigidos que codificam a bacteriocina linocina M18 e um transportador de bacteriocina em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

### 5.1 Morfologia das colônias em meios específicos

As colônias das estirpes selvagem PAL5<sup>T</sup> e mutantes para síntese e transporte de bacteriocina apresentaram-se pequenas e de cor laranja em meio sólido LGI-P, como descrito por Döbereiner et al. (1995). Foi observado no meio sólido Batata-P, onde as colônias formadas inicialmente se apresentaram claras e úmidas, assumindo coloração chocolate após sete dias de incubação a 30°C.

### 5.2. Perfil de crescimento das estirpes PAL5<sup>T</sup> e mutantes para a síntese e transporte de bacteriocina.

A Figura 37 mostra a curva de crescimento dos mutantes e da estirpe selvagem. Observa-se a diferença de turbimetria nas 48 horas de crescimento entre os mutantes para a síntese e transporte de bacteriocina (GDI\_0415 e GDI\_3499, respectivamente) e a estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup>. Foi observado que, até 8 horas de crescimento, a D.O.<sub>600 nm</sub> se manteve constante para todas as estirpes. No período de 16 a 24 horas, a estirpe selvagem apresentou uma maior turbidez do que os mutantes. A partir da coleta de 32 horas, a turbidez entre as estirpes tendeu a se uniformizar, apesar da diferença estatística (Figura 37A).



**Figura 37:** Curva de crescimento da estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> e dos mutantes para síntese e transporte de bacteriocina (GDI\_0415 e GDI\_3499, respectivamente) em meio DYGS por até 48 horas. A: Análise por espectrofotometria na densidade ótica (D.O.) de 600 nm. B: Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

Até as 8 horas de avaliação, o mutante para o transportador de bacteriocina (GDI\_3499) apresentou maior quantidade de unidades formadoras de colônias. Após esse período, a estirpe selvagem apresentou maior crescimento que os mutantes até o tempo de coleta de 16 horas. Nos demais tempos de coleta, todas as estirpes apresentaram número de células semelhantes (Figura 37B). A análise dos parâmetros de crescimento da estirpe PAL5<sup>T</sup> e dos mutantes, gerados a partir de dados obtidos na fase logarítmica (coleta nos pontos de 8 a 24 horas), estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Parâmetros de crescimento de estirpes de *G. diazotrophicus* na fase exponencial do crescimento em meio de cultivo DYGS.

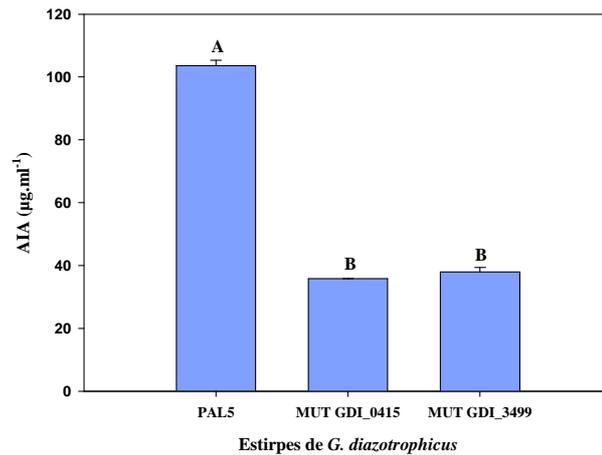
Estirpe	Nº de Gerações (n)	Tempo de Geração (g) horas	Taxa de crescimento (k) g.h <sup>-1</sup>
PAL5 <sup>T</sup>	6,94A	2,31A	0,43A
MUT GDI_0415	5,21A	2,66A	0,37A
MUT GDI_3499	6,00A	3,06A	0,32A

Os valores são referentes a 16 horas de crescimento. Letras iguais não diferem estatisticamente na mesma coluna a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados indicam diferenças nos parâmetros analisados. Entretanto, apesar dessas diferenças, o número de gerações (n), o tempo de geração (g) e a taxa de crescimento (k) dos mutantes não diferiram estatisticamente da estirpe selvagem pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 2). Em todas as estirpes, uma população de aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> foi observada na fase estacionária de crescimento e se manteve até o final das análises (48 horas de cultivo). Experimento semelhante foi realizado por Rodrigues (2008) que avaliou a curva de crescimento de PAL5<sup>T</sup> em meio LGI-P durante 59 horas. Nesse experimento, também foi observada uma concentração de 10<sup>9</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> quando a PAL5<sup>T</sup> atingiu a fase estacionária. O número de gerações, o tempo de geração e a taxa de crescimento foram também muito semelhantes. Com base nos resultados, pode-se concluir que, embora o meio DYGS seja mais rico por possuir em sua composição peptona e extrato de levedura, a composição do meio de cultivo não foi um fator de variação para o crescimento da cultura. Aos 24 dias de cultivo, tanto os mutantes quanto a estirpe selvagem chegaram ao seu ponto máximo de crescimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Boniolo et al. (2009) que verificaram que o início da fase estacionária de *G. diazotrophicus* em meio DYGS foi na coleta de 25 horas. Os autores, porém, não avaliaram tempos de coletas posteriores a este período.

### 5.3 Produção de ácido indol acético

A Figura 38 mostra a quantificação de auxina produzida pelos mutantes e a estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus*.

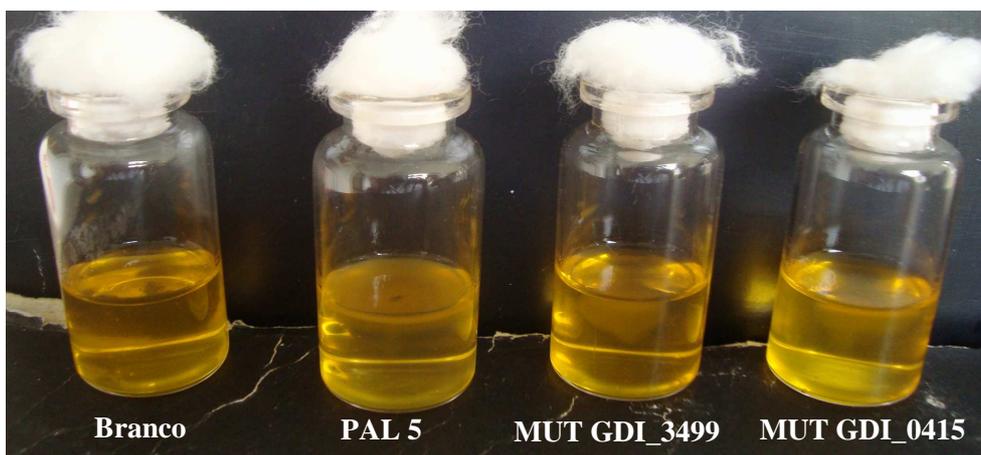


**Figura 38:** Quantificação colorimétrica de auxinas no sobrenadante de estirpes mutantes e selvagem de *G. diazotrophicus* cultivadas em meio de cultura LGI-P na presença de triptofano. Letras iguais não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na Figura 38, observa-se que a estirpe PAL5<sup>T</sup> produziu mais auxina que os mutantes, que, por sua vez, apresentaram a mesma quantidade de AIA. Rodrigues (2008), em seu estudo com mutantes defectivos na produção de auxina, observou que a estirpe PAL5<sup>T</sup> de *G. diazotrophicus* produziu 80 µg.ml<sup>-1</sup> de auxina. O mutante defectivo para a síntese de AIA apresentou uma produção de cerca de 3,8 µg.ml<sup>-1</sup>. Os mutantes defectivos para a síntese e transporte de bacteriocina, apesar de produzirem em menores quantidades de AIA, o que caracteriza um efeito pleiotrópico, não inibiram totalmente a produção como observado nos mutantes do experimento de Rodrigues (2008). Outras bactérias diazotróficas são capazes de sintetizar AIA. Estudos de Marchioro (2005) demonstraram haver produção de AIA em diferentes estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. As taxas mais altas de AIA para essas duas espécies foram de 31,52 e 29,90 µg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. El-Khawas e Adachi (1999) detectaram a produção de 35 µg.ml<sup>-1</sup> para *A. amazonense* e *Klebsiella pneumoniae* após 48 horas de cultivo. Apesar de terem sido observadas diferenças significativas na produção de AIA dos mutantes, o que provavelmente leva a crer que seja um efeito pleiotrópico, esses ainda tiveram a capacidade de produzir mais auxina quando comparados com bactérias diazotróficas de outras espécies.

#### 5.4 Crescimento em meio de cultivo sem nitrogênio

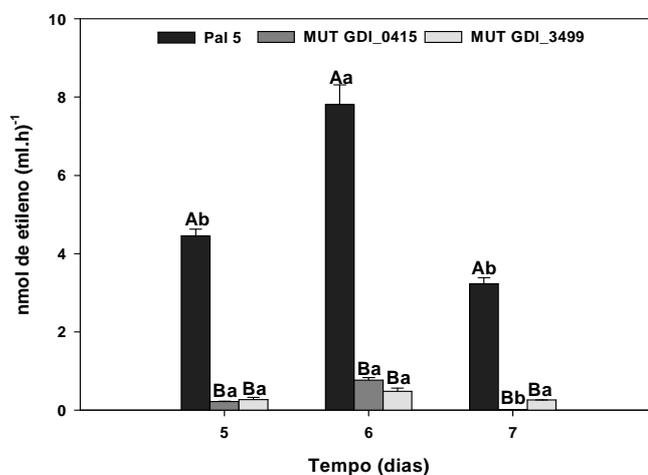
Foi observada diferença na capacidade de crescimento dependente da fixação de nitrogênio na estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> e nos mutantes para a bacteriocina e seu transportador após 4 dias de incubação no meio LGI-P (Figura 39). As estirpes mutantes não apresentaram crescimento com a formação de película característica da estirpe selvagem em LGI-P semissólido. Entretanto, pode-se observar o crescimento dos mutantes quando permaneceram cerca de 20 dias no meio LGI-P semissólido (Dados não apresentados).



**Figura 39:** Visualização da película aerotática formada por *G. diazotrophicus* após 4 dias de incubação a 30°C em meio LGI-P semissólido. O branco corresponde ao meio LGI-P sem inoculação.

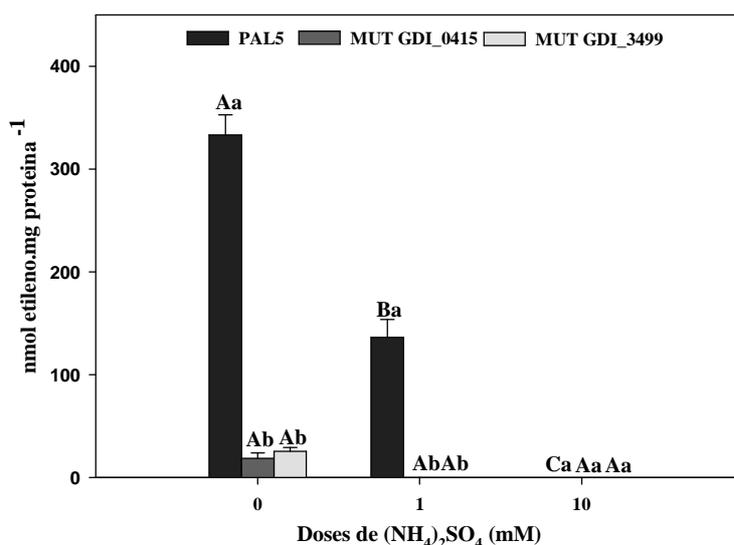
### 5.5 Avaliação da atividade da enzima nitrogenase

Os dados apresentados na Figura 40 mostram que a atividade da nitrogenase foi significativamente maior para a estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup> do que para os mutantes em todos os tempos de coleta. Também foi possível detectar a dinâmica da atividade da nitrogenase cujo maior pico se estabeleceu na coleta com seis dias de incubação. Essa diferença já era esperada, uma vez que os mutantes não formavam a película característica no meio LGI-P semissólido sem fonte de nitrogênio na primeira semana de incubação (Figura 40).



**Figura 40:** Atividade da nitrogenase da estirpe selvagem e dos mutantes de PAL5<sup>T</sup> e em meios LGI-P semissólido medida pela técnica de redução de acetileno. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente em diferentes indivíduos na mesma coleta. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente em diferentes coletas no mesmo indivíduo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A partir desse resultado, um novo experimento foi realizado, e seu tratamento se caracterizou pelo acréscimo de diferentes concentrações de fontes de nitrogênio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a fim de se obter um possível estímulo para o crescimento dos mutantes no meio semissólido. Os resultados desse experimento encontram-se na Figura 41.



**Figura 41:** Atividade da nitrogenase da estirpe selvagem e dos mutantes de PAL5 e em meios LGI-P semissólido medida pela técnica de redução de acetileno. Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente em diferentes doses de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no mesmo indivíduo. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente em diferentes indivíduos na mesma dose de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A adição de fonte de nitrogênio no meio de cultivo, não só não estimulou o crescimento das estirpes como também reduziu a atividade da nitrogenase. Para a estirpe selvagem, esse resultado era esperado. Muitos trabalhos relatam que a adição de amônio reduz a atividade da enzima nitrogenase. Hartman et al. (1986) demonstraram que a dose de 1mM de NH<sub>4</sub>Cl inibiu totalmente a atividade da nitrogenase em *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum*. Em *G. diazotrophicus*, Reis e Döbereiner (1998) também verificaram uma queda da atividade dessa enzima em *G. diazotrophicus* quando foram acrescidas diferentes concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

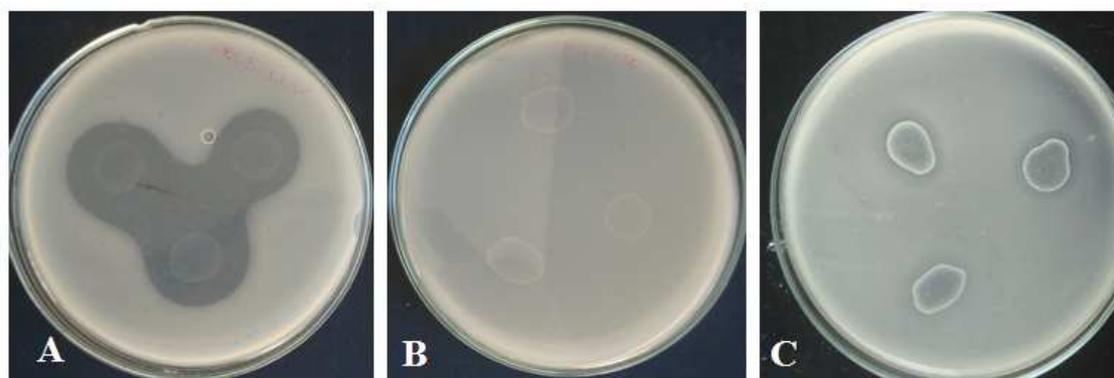
A inserção de elementos de transposição em *G. diazotrophicus* para estudos de genômica funcional é um procedimento bastante conhecido (PERLOVA et al., 2002; ROUWS et al., 2008), sendo utilizado frequentemente pelo grupo do laboratório de Genética e Bioquímica da EMBRAPA Agrobiologia, para determinação de várias funções bacterianas de *G. diazotrophicus*, tais como: FBN, motilidade, produção de compostos indólicos e adesão a superfícies (ROUWS et al., 2008; RODRIGUES, 2008; GUEDES, et al., 2008; MENESES, 2010). A premissa fundamental dessas inserções é que elas servem apenas como uma ferramenta de detecção de uma possível função gênica e que a base metabólica de outras características dos organismos transformados não será alterada pela inserção. Uma vez que outras características tenham sido alteradas, estas são de maior impacto quando se considera que a modificação inserida na espécie, tais como as contidas nos genes presentes nos elementos de transposição, não estão relacionadas com as funções básicas da bactéria.

Efeitos semelhantes foram observados por Perlova et al. (2002). Os autores observaram que, em *G. diazotrophicus*, a inserção de Tn5 no gene *glnD* causou inativação da glutamina sintetase. Embora esse gene não seja necessário para a expressão da nitrogenase, sua atividade foi significativamente inibida. Rodriguez et al. (2006) observaram que a inserção de um elemento de transposição em um gene que codifica uma proteína de choque térmico, também aparentemente não relacionado a outros genes do metabolismo de *Azospirillum brasilense*, induziu algumas alterações na fisiologia da célula, ocorrendo um aumento na fixação biológica de nitrogênio, produção de exopolissacarídeos e uma diminuição significativa na produção de ácido indol-3-acético e poli-beta-hidroxibutirato. Assim como o aumento na capacidade FBN, alterações de outros caracteres aparentemente não relacionados a tal característica também já foram relatadas, como, por exemplo, em *Azorhizobium caulinodans*, em que mutantes resistentes à azida, exibiram uma capacidade de FBN mais elevada (SAINI et al., 2001).

## 6. Teste de antagonismo da estirpe selvagem e mutantes de síntese e transporte de bacteriocina de *G. diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*

### 6.1 Teste de antagonismo induzido por UV

Não foi observado antagonismo dos mutantes e da estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup>, utilizada como produtora de substâncias antagônicas, contra a bactéria fitopatogênica *X. albilineans* no tratamento sem exposição à radiação UV (controle) (Figura não mostrada). Contudo, quando as suspensões líquidas dos mutantes e da estirpe selvagem foram expostas a radiação (Figura 42), a estirpe selvagem promoveu um halo de 2,56 cm (média de 3 repetições/placa), enquanto o mutante defectivo no transporte de bacteriocina (MUT GDI\_3499) ocasionou um halo de 1,53 cm na cultura de *X. albilineans*. Em contraste, não foi observado halo de inibição no mutante com o gene interrompido para a síntese de bacteriocina contra o fitopatógeno.



**Figura 42:** Antagonismo da estirpe selvagem e mutantes de PAL5<sup>T</sup> contra *X. albilineans* sob indução da luz ultravioleta por 20 minutos. A: estirpe selvagem PAL5<sup>T</sup>; B: mutante MUT GDI\_0415; e C: mutante MUT GDI\_3499.

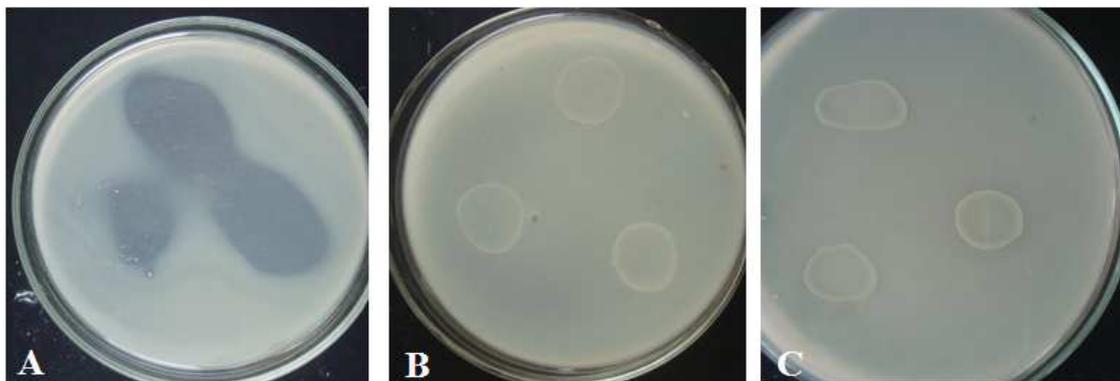
Esse resultado é um forte indício de que esta ORF é a responsável pela síntese de uma bacteriocina de efeito letal contra bactérias não relacionadas. Como já discutido no Capítulo I, a hipótese de *G. diazotrophicus* sintetizar mais de uma bacteriocina não está descartada. A bacteriocina descrita por Muñoz-Rojas et al. (2005) apresenta características diferentes da linocina M18 codificada pela ORF GDI\_0415. Além de ser mais termolábil do que a descrita pelos autores, seu peso molecular também parece ser diferente. Muñoz-Rojas et al. (2005) verificaram pela metodologia de SDS\_PAGE que a substância antagônica descoberta possui um peso de 3400 Da. Análises *in silico* realizadas pelo banco de dados ExPasy demonstraram que a GDI\_0415 contém aproximadamente 29 kDa, muito semelhante à primeira linocina descrita de *Brevibacterium linens*, que contém 31 kDa (VALDÉS-STAUER; SCHERER, 1994). Além disso, Muñoz-Rojas et al. (2005) observaram antagonismo apenas contra bactéria filogeneticamente relacionadas.

Os resultados obtidos sugerem que a linocina GDI\_0415 constitui uma ferramenta em potencial de controle biológico por *G. diazotrophicus*, não só em cana-de-açúcar como também em outras gramíneas. Porém, mais estudos são necessários para avaliar a gama de fitopatógenos que podem ser controlados por meio de uma superexpressão da substância antagônica em estudo.

### 6.2 Teste de antagonismo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Não foi observado halo de inibição na cultura de *X. albilineans* no tratamento controle (sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em nenhum dos mutantes ou da estirpe selvagem (Figura não apresentada). Como analisado no Capítulo I, só houve a formação do halo de inibição no fitopatógeno quando a suspensão celular da estirpe-selvagem PAL5<sup>T</sup> foi acrescida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 µM (Figura 43). Apesar

de ter sido observado um leve antagonismo do MUTGDI\_3499 quando foi induzido com UV, a mesma resposta não foi observada com o tratamento de adição de peróxido (Figura 43). Nas demais concentrações, não foi observada a atividade de substâncias antagônicas para a estirpe selvagem e para os mutantes. O mutante para a síntese de bacteriocina não acarretou a inibição de *X. albilineans* em nenhum dos tratamentos analisados.



**Figura 43:** Avaliação da indução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) na síntese de substâncias antagônicas na estirpe selvagem de PAL5<sup>T</sup> (A) e os mutantes MUT GDI\_0415 (B) e MUT GDI\_3499 (C) de *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans*.

Como ocorre em *Pseudomonas aeruginosa* (CHANG et al., 2005), os resultados indicam que o peróxido de hidrogênio é capaz de induzir a síntese de bacteriocina em *G. diazotrophicus*. Como já relatado anteriormente, sabe-se que o peróxido de hidrogênio pode induzir a quebra dos desoxiribonucleicos em fita simples de DNA (ANANTHASWAMY; EISENSTARK, 1977). Ou seja, como acontece quando as células são expostas a radiação UV, o peróxido de hidrogênio também pode induzir o sistema SOS de resposta. Chang et al. (2005) estudaram a expressão diferencial de proteínas de *Pseudomonas aeruginosa* quando suas células foram expostas a 1mM de peróxido de hidrogênio por 20 minutos. Os autores verificaram que, para um total de 5.700 genes, 805 foram expressos e 827 tiveram sua expressão reprimida na presença da substância. Além da expressão de genes do mecanismo de proteção celular, os autores observaram que a presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acarretou uma forte indução da síntese de piocinas. Os resultados mostrados na figura 43 corroboram com as conclusões de Chang et al. (2005).

## CONCLUSÕES

- i) Não foram observadas diferenças entre os mutantes e a estirpe selvagem em relação à coloração e morfologia das colônias em meios específicos.
- ii) A estirpe selvagem e o mutante MUTGDI\_3499 inibiram o crescimento de *X. albilineans* após exposição da cultura em meio líquido à luz ultravioleta.
- iii) O mutante MUT GDI\_0415 não produziu antagonismo contra *X. albilineans* quando suas células foram irradiadas pela luz ultravioleta.
- iv) O mutante MUT GDI\_0415 não produziu antagonismo contra *X. albilineans* quando suas células foram submetidas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um indicativo de que a ORF GDI\_0415 é realmente a responsável pelo efeito antagônico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de compostos antimicrobianos por bactérias diazotróficas contra fitopatógenos se apresenta como uma poderosa ferramenta para fins biotecnológicos no controle de patógenos de diversas culturas como, por exemplo, a *X. albilineans* que causa prejuízo para a cana-de-açúcar.

Os estudos discutidos no primeiro capítulo mostraram o antagonismo da estirpe PAL5<sup>T</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* quando culturas líquidas de PAL5<sup>T</sup> foram expostas a radiação UV. O mesmo efeito foi observado contra a estirpe *Herbaspirillum rubrisubalbicans* quando foi acrescido peróxido de hidrogênio, na concentração de 100 µM, em cultura líquida da estirpe PAL5<sup>T</sup>. Esses resultados sugeriram que a produção de compostos antimicrobianos pela estirpe PAL5<sup>T</sup> necessitou de indução de um agente externo nos experimentos realizados *in vitro*. Essa mesma indução foi necessária para a produção do antagonismo contra *X. albilineans*. Diversos trabalhos já demonstraram a necessidade de indução por agentes químicos e físicos para a produção de compostos antimicrobianos denominados bacteriocinas. O sequenciamento completo do genoma de *G. diazotrophicus* facilitou a identificação dos genes aparentemente relacionados à síntese e transporte dessas substâncias antagônicas. Além disso, possibilitou isolar e interromper esses genes com o intuito de avaliar sua funcionalidade e sua relação com o antagonismo observado contra *X. albilineans*. Foi constatado que a ORF GDI\_0415 é a responsável pelo antagonismo contra a bactéria. Já o mutante com a ORF\_3499 interrompida acarretou um leve antagonismo contra *X. albilineans* quando exposto a radiação UV. Possivelmente, mais de um transportador deve estar envolvido na secreção da bacteriocina. A caracterização e manipulação desses genes, principalmente o da bacteriocina, poderão dar suporte a novos estudos visando ao desenvolvimento de um produto biotecnológico para uso em escala comercial no controle biológico de doenças.

Desde a década de 60, na área de biotecnologia de alimentos, a bacteriocina nisina produzida por *Lactococcus lactis* é utilizada e produzida em escala comercial. Produtos como Nisaplin<sup>®</sup> e Novasin<sup>®</sup> à base de nisina são largamente utilizados nas indústrias como conservante natural de produtos lácteos, molhos, carnes e enlatados, por sua ação letal contra uma gama de bactérias Gram-positivas. No controle biológico agrícola, a bacteriocina mais conhecida é a agrocina 84, produzida pela bactéria transgênica *Rhizobium radiobacter* que possui atividade antagônica contra *Rhizobium tumefaciens* e *Rhizobium rhizogenes*. O produto comercial conhecido como NOGALL<sup>®</sup> é utilizado contra o agente etiológico da galha da coroa e usado em sementes, raízes e caules de algumas plantas frutíferas e de árvores e plantas ornamentais, sendo destinado principalmente ao uso em casa de vegetação e viveiros. O produto é comercializado em forma de inoculante turfoso com células viáveis de *R. radiobacter* e, segundo o fabricante, contém pelo menos 1,0 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de turfa ou 2,64 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> de solução em água.

Pelas leis brasileiras que regulamentam o controle da qualidade dos inoculantes comerciais (Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011, MAPA), os que contêm microrganismos diazotróficos para simbiose com leguminosa devem apresentar uma concentração de, no mínimo, 10<sup>9</sup> células viáveis por grama ou mililitro do produto, até a sua data de vencimento. Já para os demais inoculantes, formulados com bactérias associativas e promotores de crescimento de plantas, a concentração de microrganismos será informada no processo de registro do produto, de acordo com a regulamentação específica emitida por centro de pesquisa oficial ou credenciado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O inoculante desenvolvido pela Embrapa para a cana-de-açúcar contém 10<sup>9</sup> células.g<sup>-1</sup> de turfa e deverá ser produzido comercialmente pelas empresas Agrolatino Fertilizantes Especiais; Fish Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda; Stoller do Brasil e Turfal Indústria e Comércio de

Produtos Biológicos Ltda. Além do inoculante para cana-de-açúcar, a Embrapa também desenvolveu o AzoTotal<sup>®</sup>, um inoculante para trigo e milho à base de *Azospirillum brasilense*.

Segundo Ferreira (2008), a qualidade do inoculante está condicionada ao tipo de veículo, umidade, aeração e às condições ambientais a que é submetido até a sua utilização. Segundo o autor, as condições ambientais influenciam diretamente a sobrevivência do microrganismo usado, o que pode ser explicado pelas variações observadas no número de bactérias. Uma vez que o inoculante de cana-de-açúcar contém mais de uma espécie em sua composição, a interação entre as bactérias, tais como competição, síntese de substâncias antagonicas, dentre outras, deve ser considerada. Como demonstrado neste estudo, a bactéria *G. diazotrophicus* é capaz de produzir baixa concentração de substâncias antagonicas, quando exposta a UV, contra as estirpes *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, mas não contra as espécies *A. amazonense* e *B. tropica*. A característica endofítica dessas bactérias pode ser considerada vantajosa, uma vez que a colonização interna dos tecidos das plantas deve proteger as bactérias dos raios UV, reduzindo assim qualquer efeito direto. Recentemente, Lery et al. (2010) observaram que a linocina M18 (ORF GDI\_0415) é um dos genes diferencialmente expressos quando *G. diazotrophicus* é inoculada em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade Chune. Como a previsão para o uso do inoculante é via toletes ou por pulverização sobre a soca da cana-de-açúcar, a possibilidade de indução de substâncias antagonicas torna-se pequena. Entretanto, caso a inoculação seja feita via foliar, as chances serão maiores e, portanto, merecem estudos adicionais. Apesar da possibilidade de a indução de bacteriocina afetar as espécies de *Herbaspirillum* presentes no inoculante, o grande desafio refere-se à capacidade de *G. diazotrophicus* inibir a bactéria *X. albilineans*, podendo tornar-se uma ferramenta interessante no controle do fitopatógeno. Além disso, abriu possibilidades de novos estudos visando identificar possíveis antagonismos contra outros patógenos e, dessa forma, expandir a sua aplicação para outras gramíneas. Uma possibilidade biotecnológica seria a superexpressão da bacteriocina por promotores pré-selecionados da própria *G. diazotrophicus* para serem ativados em condições definidas do desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar. Contudo, uma avaliação cuidadosa do antagonismo contra microrganismos não alvos deve ser levada em consideração. Este trabalho se mostra pioneiro por definir a ORF\_0415 como responsável pela expressão da bacteriocina e pelo antagonismo contra *X. albilineans*. Além das possibilidades aqui levantadas, outros estudos se fazem necessários para o entendimento da dinâmica da relação de antagonismo *Gluconacetobacter*-fitopatógeno, principalmente a longo prazo, já que se vislumbra a produção de um produto biotecnológico para fins comerciais visando ao controle biológico de fitopatógenos em culturas como a cana-de-açúcar e outras gramíneas.

## REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 169-85, 1995.
- ALONSO, G.; VÍLCHEZ, G.; LEMOINE, V.R. How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. **International Microbiology**, v. 3, p. 81-88, 2000.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1998, p.289-381.
- ANANTHASWAMY, H.N.; EISENSTARK, A. Repair of hydrogen peroxide-induced single-strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 130, p. 187-191, 1977.
- ANGKAWIDJAJA, C.; KUWAHARA, K.; OMORI, K.; KOGA, Y.; TAKANO, K.; KANAYA, S. Extracellular secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase with a C-terminal tag by type I secretion system: purification and biochemical characterization. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 19, n. 7, p. 337-343, 2006.
- ATHAYDE, A.C. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e teleoginas de *Boophilus microplus* da região semi-árida paraibana**. Tese de doutorado. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2002. 135p.
- ARENCIBIA, A.D.; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J.; SANTANA, I.; HEMERLY, A. *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 1, n. 5, p. 265-273, 2006.
- ASSIS, S. M.P.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.I.R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas- Métodos de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 216-220,. 1998.
- AUCHER, W.; LACOMBE, C.; HÉQUET, A.; FRÈRE, J.; BERJEAUD, J.M. Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 2218-2223, 2005.
- AYMERICH, T.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L.S.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocinin the pediocin family of bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1676-1682, 1996.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p. 40-65, 2000.

BACKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W H Freeman, 1974.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.485-491, 2000.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n.3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L. HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA, E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E.B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J. R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família Poaceae (antiga gramineae). In: Mateus Rosas Ribeiro; Clístenes Willians Araújo do Nascimento; Mateus Rosas Ribeiro Filho; José Ramon Barros Cantalice.. (Org.). **Tópicos em Ciência do Solo (Topics in Soil Science)**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. VI, p. 203-272, 2009.

BANSAL, R.K.; DAHIYA, R.S.; NARULA, N.; JAIN, D.R.K. Management of *Meloidogyne incognita* in cotton, using strains of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Nematol Mediate**, v. 33, p. 101-105, 2005.

BARBOSA, M.H.P. Perspectivas para o melhoramento da cana-de-açúcar. **Simpósio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. p.1-17.

BARRETEAU, H.; BOUHSS, A.; FOURGEAUD, M.; MAINARDI, J-L.; TOUZÉ, T.; GÉRARD, F.; BLANOT, D.; ARTHUR, M.; MENGIN-LECREULX, D. Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting Colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3657-3664, 2009.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BEGLEY, M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for lanm proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5451-5460, 2009.

BELKUM, M.J.; HAYEMA, B.J.; GEIS, A.; KOK, J.; VENEMA, G. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1187-1191, 1989.

BELLOWS, T.S.; FISHER, T.W. **Handbook of Biological Control: Principles and Applications of biological Control**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2009.

BENHAMOU, N.; GAGNÉ, S.; QUÉRÉ, D.L.; DEHBI, L. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect on the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Phythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 90, p. 45-56, 2000.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRECHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTOMARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; RAELE PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450, 2009.

BINET, R.; LÉTOFFÉ, S.; GHIGO, J.; DELEPELAIRE, P.; WANDERSMAN, C. Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 3, p. 179-183, 1997.

BLANCO, Y.; BLANCH, M.; PIÑÓN, D.; LEGAZ, M.E.; VICENTE, C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 366-71, 2005.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 889-895, 2001.

BRAUN, V.; PILSL, H.; GROSS, P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. **Archives of Microbiology**, v. 161, p. 199-206, 1994.

BREUKINK, E.; WIEDEMANN, I.; VAN KRAAIJ, C.; KUIPERS, O.P.; SAHL, H.; DE KRUIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2361-2364, 1999.

BONINI, M.; MARINGONI, A.C.; RODRIGUES NETO, J. Caracterização de isolados de *Xanthomonas* spp. por bacteriocinas. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.24-29, 2007.

BONIOLO, F.S.; RODRIGUES, R.C.; DELATORRE, E.O.; SILVEIRA, M.M.; FLORES, V.M.Q.; BERBET-MOLINA, M.A. Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. **Current Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 593-599, 2009.

BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA** Nº 13, de 24 de março de 2011, Diário Oficial da União de 25 de março de 2011 (nº 58, Seção 1, pág. 3). Disponível em <[http://www.fiscolex.com.br/doc\\_20541797\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_13\\_DE\\_24\\_DE\\_MARCO\\_DE\\_2011.aspx](http://www.fiscolex.com.br/doc_20541797_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_13_DE_24_DE_MARCO_DE_2011.aspx)>. Acesso em 7 mar. 2011.

BROTZ, H.; BIERBAUM, G.; MARKUS, A.; MOLITOR, E.; SAHL, H.G. Mode of action of the lantibiotic mersacidin—inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.71-719, 1995.

CARLSSON, J.; CARPENTER, V.S. The recA+ gene product is more important than catalase and superoxide dismutase in protecting *Escherichia coli* against hydrogen peroxide toxicity. **Journal of Bacteriology**, v. 142, p. 319-321, 1980.

CARNEIRO JR, J.B. **Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado, Campos dos Goytacases: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 212p.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOS, C.; LLOUBE'S, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 158-229, 2007.

CAVALCANTE, V.A., DÖBEREINER J. A new acidtolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004.

CHANG, W.; SMALL, D.A.; TOGHROL, F.; BENTLEY, W.E. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. **BMC Genomics**, v. 6, n. 115, p. 1-14, 2005.

CHAVAN, M.; RAFI, H.; WERTZ, J.; GOLDSTONE, C.; RILEY, M.A. Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 4, p. 546-556, 2005.

CHEN, W.Y.; ECHANDI, E. Effects of avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. **Plant Pathology**, v. 33, p. 245-253, 1984.

CLARK, D.; DURNER, J.; NAVARRE, D.A.; KLESSIG, D.F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 13, p. 1380-1384, 2000.

COELHO, C.H.; MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; XAVIER, R.P.; RESENDE, A.; QUESADA, D. M.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R. URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 37-40, 2003.

COJHO, E.H.; REIS, V.M.; SCHENBERG, A.C.G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, p. 341-346, 1993.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. Sugarcane leaf scald disease. 2002. Disponível em: <[http://edis.ufl.edu/body\\_SC008](http://edis.ufl.edu/body_SC008)>. Acesso em: 25 set. 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_05\\_10\\_09\\_13\\_03\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_maio\\_-\\_2011\\_1o\\_lev..pdf/](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_10_09_13_03_boletim_cana_portugues_-_maio_-_2011_1o_lev..pdf/)>. Acesso em 26 de maio de 2011.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens.** APS Press, 1983.

COOKSEY, D.A.; MOORE, L.W. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. **Phytopathology**, v. 72, p. 919-21, 1982.

CURSINO, L.; SMARDA, J.; SOUZA, E.C.; NASCIMENTO, A.M.A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 185-195, 2002.

DANCE, D.A.B. Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human–animal hosts. **Acta Tropica**, v. 74, p. 159-168, 2000.

DE CARVALHO, T.L.G; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 31-41, 2011.

de los SANTOS, P.E.; PARRET, A.H.A.; de MOT, R. Stress-related Pseudomonas genes involved in production of bacteriocin LlpA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 243-250, 2005.

DINH, T.; PAULSEN, I.T.; SAIER, M.H. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 13, p. 3825-3831, 1994.

DÖBEREINER J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim Instituto de Ecologia Experimental agrícola**, v. 11, p. 1-36, 1953.

DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; LAZARINI, A.C. New N<sub>2</sub> fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In: BOTHE, H.; DE BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. (Eds.) **Nitrogen Fixation: Hundred Years After**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1988. p 717-722.

DÖBEREINER J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.; REIS, V.M. Endophytic diazotrophs: The key to BNF in gramineous plants. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Cairo: The American University in Cairo Press, 1993.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília : EMBRAPA-SPI: Itaguaí, 1995.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; McMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 564-582, 2006.

DUIJFF, B.J.; POUHAIR, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* wcs417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 903-910, 1998.

DUPUY, B.; MANI, N.; KATAYAMA, S.; SONENSHEIN, A.L. Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel  $\sigma$  factor. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1196-1206, 2005.

ECHANDI, E.; MOYER, J.W. Production, properties and morphology of bacteriocins from *Erwinia chrysanthemi*. **Physiology and Biochemistry**, v. 69, n. 11, p. 1204-1207, 1979.

EISENSTARK, A. Bacterial genes involved in response to near-ultraviolet radiation. **Advanced Genetics**, v. 26, p. 99-147, 1989.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, p. 377-381, 1999.

ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**, ed: Springer, 2007.

EMBRAPA MONITORAMENTO POR SATÉLITE. Disponível em: < <http://www.cana.cnpm.embrapa.br/>>. Acesso em: 23 fev. 2011.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, n. 85, p. 85-106, 2000.

EXPERT, D.; TOUSSAINT, A. Bacteriocin-resistant mutants of *Erwinia chrysanthemi*: possible involvement of iron acquisition in phytopathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 1, p. 221-227, 1985.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Disponível em <[www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acesso em 23 nov. 2010.

FARR, S.B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 561-585, 1991.

FATH, M.J.; KOLTER, R. ABC transporters: bacterial exporters. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 57, n. 4, p. 995-1017, 1993.

FERREIRA, J. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. Tese de doutorado. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008. 210p.

FOUTS, D.E.; TYLER, H.L.; de BOY, R.T.; DAUGHERTY, S.; REN, Q.; BADGER, J.H.; DURKIN, A.S.; HUOT, H.; SHRIVASTAVA, S.; KOTHARI, S. Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genetics**, v.4, n. 7, p. 1-18, 2008.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v. 51, p. 1305–1314, 2001.

GAJIC, O.; KOJIC, M.; BANINA, A.; TOPISIROVIC, L.J. Characterization of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5, a strain producing two bacteriocins, cell wall-associated proteinase and showing clumping phenotype. **Archives of Biological Sciences**, v. 51, n. 2, p. 69-78, 1999.

GARCERÁ, M.J.G.; ELFERINK, M.G.L.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin role of proton motive force and lipid composition. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, p. 417-422, 1993.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GILLOR, O.; NIGRO, L.M.; RILEY, M.A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 1-9, 2005.

GORELENKOV, V.; ANTIPOV, A.; LEJNINE, S.; DARASELIA, N.; YURYEV, A. Set of novel tools for PCR primer design. **Biotechniques**, v. 31, n. 6, p. 1326-1330, 2001.

GRANT, S.G.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4645-4649, 1990.

GROSS, D.C.; VIDAVER, A.K. Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing Rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 936-943, 1978.

GUDER, A.; WIEDEMANN, I.; SAHL, H.G. Posttranslationally modified bacteriocins - the lantibiotics. **Biopolymers**, v. 55, p. 62-73, 2000.

GUEDES, H.V.; ROUWS, L.F.M.; OLIVEIRA, A.L.M. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 Strain: selection and characterization of mutants deficient in nitrogen-fixation ability. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v. 42, p. 321-322, 2008.

GUYON, S.; VOGEL, J.L.; OMARJEE, J.; VAN ANTWERPEN, T.; CADET, P.; BALANDREAU, J. *Burkholderia tropicalis*, a potential bacterial inoculant to control nematodes and improve sugarcane growth. **Proceedings Congress of the South African Sugar Technologists Association**, v. 7, p. 118-123, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALMMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 165, p. 864-887, 1986.

HU, F.P.; YOUNG, J.M. Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 263-271, 1998.

IMLAY, J.A.; LINN, S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 797-799, 1986.

IMLAY, J.A.; LINN, S. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 2967-2976, 1987.

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Post transcriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploidy genome. **Plant Physiology**, 119, p. 1187-1197, 1999.

INSTITUTO BIOLÓGICO. Disponível em <<http://www.biologico.sp.gov.br/noticias.php?id=99>>. Acesso em 23 jun. 2009.

IVANOVICS, G. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 26, p. 108-118, 1962.

IZQUIERDO, E.; MARCHIONI, E.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C.; ENNAHAR, S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 26, p. 16-20, 2009.

JABRANE, A.; SABRI, A.; COMPÈRE, P.; JACQUES, P.; VANDENBERGHE, I.; BEEUMEN, J.V.; THONART, P. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5704-5710, 2002.

JACK, R.W.; TAGG J.R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, v. 59, p. 171-200, 1995.

JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVIRCH, A.; WOLLMAN, P. Definition de quelques termes relatifs à la lysogenie. **Annual Institute Pasteur**, v. 84, p.222-224, 1953.

JAMES, R.; KLEANTHOS, C.; MOORE, G.R. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. **Microbiology**, v. 142, p. 1569-1580, 1996.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARUA, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

JOLLIVET, N.; BÉZENGER, M.C.; VAYSSIER, Y.; BELIN, J.M. Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 36, n. 6, p. 790-794, 1992.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195, 202, 1999.

JUNG, G.; SAHL, H.G. Lantibiotics: a survey. In **Nisin and Novel Lantibiotics**, p. 1-34, 1991.

KAMOUN, F.; FUGUIRA, I.B.; TOUNSI, A.; BDELKEFI-MESRATI, L.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; JAOUA, S. Generation of Mini-Tn10 transposon insertion mutant library of *Bacillus thuringiensis* for the investigation of genes required for its bacteriocin production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, p. 141-149, 2009.

KAWAGUCHI, A.; INOUE, K.; NASU, H. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. **Journal of Genetic Plant Pathology**, v. 73, p. 133-138, 2007.

KÉKESSY, D.A.; PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. **Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-283, 1970.

KEMP, B.P.; HORNE, J.; BRYANT, A.; COOPER, R.M. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 209-218, 2004.

KERR, A. A biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, v. 64, p. 24-30, 1980.

KHALIL, R.; ELBAHLOUL, Y.; DJADOUNI, F.; OMAR, S. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 242-250, 2009.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemistry**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **EMS Microbiological Review**, v. 12, p. 39-85, 1993.

KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS, D.; BATTISTONI, F.; BEKEL, T.; BOCH, J.; BOEHM, M.; FRIEDRICH, F.; HUREK, T.; KRAUSE, L. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1385-1391, 2008.

KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A.M.; GERMAIN, P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 359-363, 1998.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

KYEREMEH, A.G.; KIKUMOTO, T.; CHUANG, D.; GUNJI, Y.; TAKAHARA, Y.; EHARA, Y. Biological control of soft rot of chinese cabbage using single and mixed treatments of bacteriocin-

producing avirulent mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. **Journal of Genetic Plant Pathology**, v. 66, p. 264-268, 2000.

LAMBAIS, M.R. *In silico* differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. **Genetic Molecular Biology**, v. 24, p. 103-111, 2001.

LAVERMICOCCA, P.; LONIGRO, S.L.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; VISCONTI, A. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1403-1407, 2002.

LAZDUNSKI, C.J. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. **Biochemistry**, v. 70, p. 1291-1296, 1988.

LAZDUNSKI, C.; BOUVERET, E.; RIGAL, A.; JOURNET, L.; LLOUBÈS, R.; BÉNÉDETTI, H. Colicin import into *Escherichia coli* cells requires the proximity of the inner membranes and others factors. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, p. 337-344, 2000.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J.E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 5384-5391, 2004.

LERY, L.M.S.; COELHO, A.; VON KRUGER, W.M.A.; GONÇALVES, M.S.M.; SANTOS, M. F.; VALENTE, R.H.; SANTOS, E.O.; ROCHA, S.L.G.; PERALES, J.; DOMONT, G.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; BISCH, P.M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**, v. 8, p. 1631-1644, 2008.

LERY, L.M.S.; HEMERLY, A.S.; NOGUEIRA, E.M.; VON KRÜGER, W.M.A.; BISCH, P.M. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. **Molecular plant-microbe interactions**, v.54, p.245-250, 2010.

LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. **Cell**, v. 29, p. 11-22, 1982.

LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, n. 4, p. 3564-3567, 2009.

MA, H.M.; ALBERT, H.H.; PAULL, R.; MOORE, P.H. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cells. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 1021-1030, 2000.

MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; JIMÉNEZ, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RUIZ-BARBA, J.L.; RODRÍGUEZ, J.M. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrums. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 105-112, 2009.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Dissertação de mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 74p.

MARTIN, I.; RUYSSCHAERT, J.M.; SANDERS, D.; GIFFARD, C.J. Interaction of the lantibiotic nisin with membrane revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. **European Journal of Biochemistry**, v. 239, p. 156-164, 1996.

MATSUI, H.; SANO, Y.; ISHIHARA, H.; SHINOMIYA, T. Regulation of pyocin gGenes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) Regulatory genes. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 5, 1993.

MATTICK, A.T.R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) produced by group N streptococci. **Lancet**, v. 2, p. 5-7, 1947.

MCGUFFIN, L.J.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 404-405, 2000.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbiol Ecology**, v. 51, p. 326-335, 2006.

MENESES, C.H.S.G. **Definição do papel do exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 na sobrevivência à estresses abióticos e nas etapas iniciais do processo de colonização de raízes de arroz**. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 212p.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p. 808-811, 1990.

MOLL, G.N.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J.M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p.185-198, 1999.

MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p. 511-519, 1998.

M'PIGA, P.; BELANGER, R.R.; PAULILTZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 301-320, 1997.

MUKHOPADHYAY, K.; GARRISON N.K.; HINTON, D.M.; BACON, C.W.; KHUSH, G.S.; PECK, H.D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v. 134, n. 3, p. 151-159, 1996.

MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 57-66, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, p. 157-164, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R. Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, v. 78, n. 9, p. 1063-1066, 2000.

NES, I.F.; DIEP, D.P.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, p.113-128, 1996.

NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. (Eds.). **Cell-cell signalling in bacteria**. Washington: American Society for Microbiology, p. 175-192, 1999.

OGUNBANWO, S.T.; SANNI, A.I.; ONILUDE, A.A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 8, p. 219-227, 2003.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E. de L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

ONBASLI, D.; ASLIM, B. Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 24, p. 4614-4619, 2008.

PARRET, A.H.A.; SCHOOF, G.; PROOST, P.; DE MOT, R. Plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 897-908, 2003.

PARRET, A.H.A.; TEMMERMAN, K.; DE MOT, R. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* pf-5. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5197-5207, 2005.

PARTIDA-MARTINEZ, L.P.; HERTWECK, C. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "*Burkholderia rhizoxina*", the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microspores*. **A European Journal of Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 41-45, 2007.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batatas*), sugarcane (*Saccharum* sp.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, p. 111-115, 1991.

PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 25-35, 2008.

PEIXOTO NETO, P.A. de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PERLOVA, O.; NAWROTH, R.; ZELLERMANN, E.M.; MELETZUS, D. Isolation and characterization of the *glnD* gene of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, encoding a putative uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme. **Gene**, v. 297, n. 1, p. 159-168, 2002.

PIÑÓN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M.T.; LEGAZ, M.E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. **Research Microbiology**, v. 153, p. 345-351, 2002.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

QUIRINO, M. S. **Polimorfismo de sequência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência**. Dissertação de mestrado. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, 2003. 53p.

RAIZER, A. J. **Interações genótipos x ambientes e estabilidade fenotípica em cana-de-açúcar no Estado de São Paulo**. Dissertação de mestrado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998. 103p.

REA, M.C; SITC, C.S.; CLAYTONA, E.; O'CONNORA, P.M.; WHITTALC, R.M.; ZHENG, J.; VEDERASC, J.C.; ROSSA, P.; HILL, C. Thuricin CD. A post translationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9352-9357, 2010.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 139-144, 1998.

REIS, V. M. **Estudos de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994. 213 p.

REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. **Archives of Microbiology**, v. 171, p. 13-18, 1998.

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2261-2268, 2002.

RICAUD, C.; RYAN, C. Leaf scald. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T; GILLASPIE JR, A.G.; HUGHES, C. G. (Eds). **Diseases of Sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1989. p. 39-53.

RILEY, M.A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 255-278, 1998.

RILEY, M.A.; GORDON, D.M.; A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 1345-1352, 1992.

RODRIGUES, E.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; VIDAL, M.S.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; BALDANI, J.I. Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) com alterações na produção de auxinas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 27, Embrapa Agrobiologia, 2007.

RODRIGUES, E. P. **Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas**. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. 146p.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1986.

RODRIGUEZ, H.; MENDOZA, A.; CRUZ, M.A.; HOLGUIN, G.; GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Pleiotropic physiological effect in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* following chromosomal labeling in the *clpX* gene. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 217-225, 2006.

RILEY, M.A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 255-278, 1998.

RILEY, M.A.; CHAVAN, M.A. **Bacteriocins: Ecology and Evolution**, ed. Springer, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. ed. UFV, 2005.

ROSA, C.M.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas, **ConSCIENTIAE SAÚDE**, v. 1, p. 9-15, 2002.

ROSS, E.J.; STONE, J.M.; ELOWSKY, C.G.; ARREDONDO-PETER, R.K.; LUCAS, R.V.; SARATH, G. Activation of *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin – 2 promotor by the cytokinin-regulated transcription factor ARR1. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1721-1731, 2004.

ROSSETTO, R.; DIAS, F.L.F.; VITTI, A.C.; CANTARELLA, H. Manutenção da fertilidade e recuperação dos solos na cultura da cana-de-açúcar. In: CORTEZ, L.A.B. (Org. ). **Bioetanol de Cana-de-açúcar: P&D para Produtividade e Sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 381-403.

ROUWS, L.F.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; HEMERLY, A.S.; BALDANI, J.I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives of Microbiology**, v. 189, n. 4, p. 397-405, 2008.

RUHR, E.; SAHL, H.G. Mode of action of peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p. 841-845, 1985.

SACIOTO, R.F.Z. **Inserção do gene *pr5k* em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. Dissertação de mestrado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. 74p.

SAHL, H.G.; KORDEL, M.; BENZ, R. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisine. **Archives of Microbiology**, v. 149, p. 120-124, 1987.

SAINI, I.; SINDHU, S.S.; DADARWAL, K.R. Azide-resistant mutants of *Azorhizobium caulinodans* with enhanced symbiotic effectiveness. **Folia Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 217-222, 2001.

SAKTHIVEL N.; MEW, T. W. Efficacy of bacteriocinogenic strains of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* on the incidence of bacterial-blight disease of rice (*Oryza-sativa*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 764-768, 1991.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Interaction of new diazotrophic endophytic bacteria and nitrogen fertilization on wheat crop under field conditions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1099-1106, 2008.

SALES, J.F.; GITAHY, P.M.; SKOT, L.; BALDANI, J.I. Use of endophytic bacteria as a vector to express the cry3A gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 155-161, 2000.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, N. 7, p. 4012-4020, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 90-91, 1998.

SANO, Y.; KAGEYAMA, M. A novel transposon-like structure carries the genes for pyocin AP41, a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin with a DNase domain homology to E2 group colicins. **Molecular and General Genetcs**, v. 237, n. 1, p. 161-170, 1993.

SANTOS, A. S. **Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Biológico. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, 2005.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T.M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 130-140, 2007.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*-minus mutant strains. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

da SILVA, R.A. ***Gluconacetobacter diazotrophicus*: estudos de mecanismos de biocontrole contra o raquitismo do raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) em cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*)**. Tese de doutorado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009. 214p.

SMADA, J.; SMAJS, D. Colicins: exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. **Folia Microbiologica**, v. 43, p. 563-582, 1998.

SPANGLER, R.; ZHANG, S.; KRUEGER, J.; ZUBAY, G. Colicins synthesis and cell death. **Journal of Bacteriology**, v. 163, p. 167-173, 1985.

STRANGE, R. N. **Introduction to Plant Pathology**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2003.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 162-167, 1998.

SUEDZUCKER. Disponível em: <<http://www.suedzucker.de/en/Zucker/Zahlen-zum-Zucker/Welt/>>. Acesso em: 23 nov. 2010.

SUTTER, M.; BOEHRINGER, D.; GUTMANN, S.; GÜNTHER, S.; PRANGISHVILI, D.; LOESSNER, M.J.; STETTER, K.O.; WEBER-BAN, E.; BAN, N. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, p. 939-947, 2008.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriology Review**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M.R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 49-55, 2000.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Currents Protocols in Bioinformatics**, v. 2, p. 2-3, 2002.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.207-225.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.E.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.

VALDÉS-STAUBER, N.; SCHERER, S. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3809-3814, 1994.

VAN ANTWERPEN, T.; RUTHERFORD, R.S.; VOGEL, J.L. Assessment of sugarcane endophytic bacteria and rhizospheric Burkholderia species as antifungal agents. **Proceedings Congress of the South African Sugar Technologists Association**, v. 76, p. 301-304, 2002.

VAN KRAAIJ, C.; de VOS, W.M.; SIEZEN, R.J; KUIPERS, O.P. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. **Natural Product Report**, v. 16, p. 575-587, 1999.

VON DER WEID, I.; ALVIANO, D.S.; SANTOS, A.L.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; SELDIN, L. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1143-1151, 2003.

VON HEIJNE, G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. **Journal of Molecular Biology**, v. 225, n. 2, p. 487-94, 1992.

WEBER, O.B; MUNIZ, C.R.; VITOR, A.O.; FREIRE, F.C.O.; OLIVEIRA, V.M. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on plantlets of banana 'Maçã'. **Plant and Soil**, v.298, p. 47-56, 2007.

XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. Dissertação de mestrado. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002. 108p.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.I.; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter* nom.corrig. *Gluconacetobacter* (sic). In: validation of publication of new names and new combinations previously effectively published out side the IJSB. List no. 64. **International Journal Systematic of Bacteriology**, v. 48, p. 327-328, 1998.

YONEZAWA, H.; KURAMITSU, H.K.; NAKAYAMA, S.; MITOBE, J.; MOTEGI, M.; NAKAO, R.; WATANABE, H.; SENPUKU, H. Differential expression of the smb bacteriocin in *Streptococcus mutans* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2742-2749, 2008.

ZANETTI, F.; DE LUCA, G.; STAMPI, S. Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 67-72, 2000.

ZIHLER, A.; BLAY, G.L.; WOUTERS, T.D.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.P.; LEHNER, A.; TISCHLER, P.; RATTEI, T.; CHLER, H.; STEPHAN R. *In vitro* inhibition activity of different bacteriocin producing *Escherichia coli* against Salmonella strains isolated from clinical cases. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 31-38, 2009.

## ANEXOS

### Meios de cultivo e soluções utilizadas

#### 1. Meio de cultivo DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986)

Glicose	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada	1000 ml (q.s.p)

Todos os ingredientes foram adicionados à água destilada e o pH do meio foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 10%. Para o preparo de meio sólido, adicionou-se 15 g.l<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico.

#### 2. Meio de cultivo LB (SAMBROOK et al., 2000)

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Água destilada	1000 ml (q.s.p)

Todos os ingredientes foram adicionados à água destilada e o pH do meio foi ajustado para 6,0. Para o preparo de meio sólido, adicionou-se 15 g.l<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico.

#### 3. Meio de cultivo C2 (TEIXEIRA et al., 1999)

Glicose	15,0g
Peptona bacteriológica	10,0g
Extrato de levedura	5,0g
NaCl	5,0g
Água destilada	1000 ml (q.s.p)

Todos os ingredientes foram adicionados à água destilada e o pH do meio foi ajustado para 6,0.

#### 4. Meio de cultivo LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995)

Açúcar cristal	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,001 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g
Azul de bromotimol	5 ml
Solução de vitaminas*	1 ml
Água destilada	1000 ml (q.s.p.)

Todos os ingredientes foram adicionados à água destilada e o pH do meio foi ajustado para 5,5, com solução de ácido acético 10%. Para o preparo de meio sólido, adicionou-se 25g.l<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico.

\*A solução de vitaminas utilizada consiste em 10 mg de biotina e 20 mg de vitamina B6 em 100 ml de água destilada.

### 5. Meio de cultivo LGI-P modificado

No preparo do meio LGI-P modificado, todos os ingredientes, exceto o azul de bromotimol, foram adicionados à água destilada. Adicionou-se ainda 1,32 g.l<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O pH do meio foi ajustado para 5,5, com solução de ácido acético 10%.

### 6. Solução de L-Triptofano (10 mg.ml<sup>-1</sup>)

L-triptofano	1 g
Água destilada	100 ml (q.s.p)

O L-triptofano deve ser dissolvido em 10 ml de água, adicionando-se aos poucos uma solução de NaOH até a completa dissolução. Após completar o volume para 100 ml de água destilada e esterilizar por filtração (0,22 µm), adicionando-se 1 ml da solução estoque para cada 100 ml de meio de cultura.

### 7. Reagente de Salkowski (GORDON; WEBER, 1952)

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (0,5M)	1 ml
HClO <sub>4</sub> (35%)	50 ml

As soluções devem ser preparadas separadamente e a mistura deve ser feita previamente ao uso.