

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA BACTERIOCINA
GLUCONACINA RECOMBINANTE DE *Gluconacetobacter*
diazotrophicus, ESTIRPE PAL5, SOBRE MICRORGANISMOS
DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA PARA AS CULTURAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR E TOMATE**

ELIZABETH TEIXEIRA DE ALMEIDA RAMOS

2018



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

Potencial biotecnológico da bacteriocina gluconacina recombinante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe pal5, sobre microrganismos de importância agrícola para as culturas de cana-de-açúcar e tomate

ELIZABETH TEIXEIRA DE ALMEIDA RAMOS

Sob a Orientação do
PhD. José Ivo Baldani
e Co-orientação da.
Dsc. Márcia Soares Vidal

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutora**
em Fitotecnia, no curso de Pós-
Graduação em Fitotecnia

Seropédica, RJ
Setembro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R165p Ramos, Elizabeth Teixeira de Almeida, 1988-
Potencial biotecnológico da bacteriocina
gluconacina recombinante de *Gluconacetobacter*
diazotrophicus, estirpe pa15, sobre microrganismos de
importância agrícola para as culturas de cana-de-açúcar
e tomate / Elizabeth Teixeira de Almeida Ramos. -
2018.
93 f.: il.
Orientador: José Ivo Baldani.
Coorientadora: Márcia Soares Vidal.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PPGF, 2018.
1. Peptídeo antimicrobiano. 2. Controle biológico.
3. Atividade antibacteriana. I. Baldani, José Ivo,
1953-, orient. II. Vidal, Márcia Soares, 1973-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PPGF. IV. Título.

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

ELIZABETH TEIXEIRA DE ALMEIDA RAMOS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM: 27/09/2018

Dr. José Ivo Baldani (EMBRAPA Agrobiologia)
(Orientador)

Dra. Margarida Goréte Ferreira do Carmo (UFRRJ)
(Titular)

Dra. Cristiane Martins Cardoso de Salles (UFRRJ)
(Titular)

Dr. Stefan Schwab (EMBRAPA Agrobiologia)
(Titular)

Dr. Luis Henrique de Barros Soares (EMBRAPA Agrobiologia)
(Titular)

DEDICATÓRIA

À minha família, por ser meu porto seguro nas horas que mais precisei, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai por me amparar nos momentos de fraqueza, e aos amigos espirituais por todo auxílio e inspiração.

Ao orientador Ivo Baldani por todo aprendizado e paciência em cada “*não deu certo, chefe*”.

À co-orientadora Márcia Vidal, por todo auxílio e experiência.

Ao PPGFitotecnia e à Embrapa por possibilitar a materialização desse sonho.

À Dra. Gorete e ao Dr. João, por todo auxílio em fitopatologia.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia, em especial :Sr. Claudinho e Seu Amarildo, por facilitar tantas vezes nosso trabalho. Ao Geraldo Baêta, pelas risadas e a prontidão em sempre ajudar. Ao Ernani, Roberto e Seu Aurélio, pela imensa ajuda nos trabalhos em casa de vegetação. À Karine, pela simplicidade em demonstrar toda sua experiência nos trabalhos de microscopia. Ao Stefan, por todo conhecimento e prontidão. Às analistas/ amigas Carol e Pat por todo auxílio ao longo do trabalho.

À Gabi e Paula, pela amizade e por toda orientação na parte estatística.

À minha família por todo amor e colo em cada etapa.

Ao meu amor Antonio por ter o melhor abraço, pela compreensão e por me fazer rir nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos por tornarem meus dias mais leves, especialmente a Jéssica Veronezze, por toda sintonia!

À todos os companheiros do LGB por tornarem os dias no laboratório mais leves.

Aos amigos que o doutorado me deu: Fran, Jéssica, Amanda, Tati, Nathalia , Cleiton e Lu. Vocês foram fundamentais!

À todos que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho,

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

Gluconacina é uma bacteriocina produzida pela bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe PAL5. O presente estudo teve como objetivo estabelecer as melhores condições para produção heteróloga e purificação desse peptídeo antimicrobiano, e avaliar seu espectro de ação sobre fitopatógenos e bactérias benéficas de importância para as culturas de cana-de-açúcar e tomate. Foram realizadas avaliações *in vitro* para elucidar o mecanismo de ação dessa bacteriocina, além de verificar sua estabilidade frente à alterações físicas e químicas. O potencial biotecnológico da gluconacina foi testado *in vivo* em plantas de tomate na proteção contra *Xanthomonas perforans*, agente causal da mancha bacteriana. Os resultados demonstraram que a gluconacina recombinante foi expressa e purificada de forma satisfatória. Este agente antimicrobiano demonstrou amplo espectro de atuação, inibindo o crescimento de todos os fitopatógenos bacterianos avaliados. Em adição, a gluconacina também demonstrou antagonismo contra algumas estirpes benéficas pertencentes a espécies de *Bacillus* e outras estirpes de *G. diazotrophicus*. Células do fitopatógeno *X. albilineans* (microrganismo modelo) tratadas com a bacteriocina apresentaram perda de fosfato inorgânico e compostos absorventes de UV. As análises de microscopia de varredura demonstraram que as células foram totalmente lisadas após o tratamento, sugerindo que a bacteriocina gluconacina altera a integridade da membrana e aumenta sua permeabilidade, resultando em completa lise celular. Os resultados de caracterização físico-química indicaram estabilidade da atividade antibacteriana em altas temperaturas e pH's ácidos, enquanto foi observada redução dessa atividade após o tratamento com algumas proteases e surfactantes. As avaliações em casa de vegetação demonstraram significativa redução dos sintomas da mancha bacteriana em plantas tratadas com o peptídeo antimicrobiano, sugerindo grande potencial biotecnológico.

Palavras-chave: peptídeo antimicrobiano, controle biológico, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Gluconacin is a bacteriocin produced by the diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL5. The present study aimed to establish the best conditions for heterologous production and purification of this antimicrobial peptide and to evaluate its spectrum on phytopathogens and beneficial bacteria of importance for sugarcane and tomato crops. *In vitro* evaluations were performed to elucidate the mechanism of action of this bacteriocin, as well as to verify its stability against physical and chemical changes. The biotechnological potential of gluconacin was tested *in vivo* in tomato plants the protection against *Xanthomonas perforans*, causal agent of the bacterial spot. The results demonstrated that recombinant gluconacin was expressed and purified satisfactorily. This antimicrobial agent demonstrated a broad spectrum of action, inhibiting growth of all bacterial phytopathogens evaluated. In addition, gluconacin has also shown antagonism against some beneficial strains belonging to species of *Bacillus* and other strains of *G. diazotrophicus*. Phytopathogen *Xanthomonas albilineans* cells (model microorganism) treated with bacteriocin showed loss of inorganic phosphate and UV absorbing compounds. Scanning microscopy analyzes demonstrated that the cells were fully lysed after treatment, suggesting that bacteriocin gluconacin alters the integrity of the membrane and increases its permeability, resulting in complete cell lysis. The physico-chemical characterization results indicated stability of the antibacterial activity at high temperatures and acid pH's, while a reduction of this activity was observed after treatment with some proteases and surfactants. Greenhouse evaluations showed a significant reduction of bacterial spot symptoms in plants treated with the antimicrobial peptide, suggesting a great biotechnological potential.

Key-words: antimicrobial peptide, biological control, antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Efeito da temperatura de cultivo da estirpe hospedeira portadora do vetor de expressão e tempos de indução sobre o nível de expressão da gluconacina recombinante. A) 16°; B) 25°. Colunas 1 e 2: Frações solúvel e insolúvel em T0 (0 min), Colunas 3 e 4: Frações solúvel e insolúvel em T1 (0,5 hora), Colunas 5 e 6: Frações solúvel e insolúvel em T2 (1 hora). Colunas 7 e 8: Frações solúvel e insolúvel em T3 (2 horas), Colunas 9 e 10: Frações solúvel e insolúvel em T4 (4 horas), Colunas 11 e 12: Frações solúvel e insolúvel em T5 (6 horas). M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™) 25
- Figura 2** - Efeito da temperatura de cultivo da estirpe hospedeira portadora do vetor de expressão e tempos de indução sobre o nível de expressão da gluconacina recombinante. A) 30°; B) 37°. Colunas 1 e 2: Frações solúvel e insolúvel em T0 (0 min), Colunas 3 e 4: Frações solúvel e insolúvel em T1 (0,5 hora), Colunas 5 e 6: Frações solúvel e insolúvel em T2 (1 hora). Colunas 7 e 8: Frações solúvel e insolúvel em T3 (2 horas), Colunas 9 e 10: Frações solúvel e insolúvel em T4 (4 horas), Colunas 11 e 12: Frações solúvel e insolúvel em T5 (6 horas). M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™) 26
- Figura 3** - Efeito da temperatura de cultivo da estirpe hospedeira BL21 (controle) e portando o vetor de expressão, e tempos de indução sobre o nível de expressão da gluconacina recombinante. A) 16°C, B) 25°, C) 30°C e 37°C e tempos de indução da expressão da proteína (setas). BL21-AI com indução nos tempos: T0 (0 min) (Coluna 1), T1 (0,5 hr) (Coluna 3), T2 (1 hr) (Coluna 5), T3 (2hrs) (Coluna 7), T4 (4 hrs) (Coluna 9), T5 (6 hrs) (Coluna 11). BL21_p17_GDI0415_HIS com indução nos tempos: T0 (0 min) (Coluna 2), T1 (0,5 hr) (Coluna 4), T2 (1 hr) (Coluna 6), T3 (2hrs) (Coluna 8), T4 (4 hrs) (Coluna 10), T5 (6 hrs) (Coluna 12).. 27
- Figura 4** - Expressão da gluconacina recombinante (em destaque) sob diferentes temperaturas de cultivo da estirpe hospedeira portando o vetor de expressão e 24 horas (T6) de indução da expressão. Colunas 1 e 2: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas a 16°C. Colunas 3 e 4: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas à 25°C. Colunas 5 e 6: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas à 30°C. Colunas 7 e 8: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas à 37°C. M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™) 28
- Figura 5** - Expressão da gluconacina recombinante obtida do cultivo das células hospedeiras em meio SB (Fração solúvel – Coluna 1, Fração Insolúvel – Coluna 2) e LB (Fração solúvel – Coluna 3, Fração Insolúvel – Coluna 4). M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™) 29
- Figura 6** - Perfis de crescimento da estirpe BL21-AI_p17GDI0415 em agitador e biorreator. * Adição do indutor L-arabinose 0,2% 31
- Figura 7** - Expressão da gluconacina recombinante sob cultivo realizado em biorreator (180 rpm, 25°C, vazão do ar: 2vvm, pressão O2: 100%) (Coluna 1) e agitador (180 rpm, 25°C) ... 31
- Figura 8** - Efeito da concentração de imidazol no tampão de lavagem sobre a eficiência do processo de purificação da gluconacina recombinante. Coluna 1: 1º passagem pela coluna de purificação; Coluna 2: lavagem – 5mM imidazol; Coluna 3: lavagem - 10 mM imidazol; Coluna 4: lavagem - 20 mM imidazol, Coluna 5: lavagem - 50 mM imidazol, Coluna 6: lavagem - 100 mM imidazol; Coluna 7: lavagem - 200 mM imidazol; Coluna 8: eluato; M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™) 33
- Figura 9** - Perfil eletroforético das amostras coletadas ao longo das etapas de purificação da gluconacina recombinante conforme o Protocolo B de purificação. A) amostra processada e purificada na ausência de sarcosil (controle); B) amostra processada e purificada com

sarcosil (10%). Coluna 1: Fração solúvel; Coluna 2: 1º passagem pela coluna de purificação; Coluna 3: 1º lavagem; Coluna 4: 4º lavagem; Coluna 5: eluato. M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)	35
Figura 10 - Efeito da concentração de imidazol nos tampões do protocolo B sobre a eficiência do processo de purificação da gluconacina recombinante. Tampões de ligação e de lavagem L2, respectivamente. T1: 5mM/ 25 mM; T2 5mM/30 mM; T3: 10mM/ 20 mM; T4: 10 mM/ 25 mM e T5: 10mM/ 30mM. Colunas 1, 3, 5, 7 e 9 correspondem às eluições mais puras de cada tratamento, Colunas 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem às eluições totais de cada tratamento.	36
Figura 11 - Antagonismo de <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5), induzido com H ₂ O ₂ , contra as bactérias: A) <i>X. albilineans</i> , B) <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , C) <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> , D) <i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> , E) <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>	39
Figura 12 - Antagonismo de <i>G. diazotrophicus</i> (MUT GDI_0415), induzido com H ₂ O ₂ , contra as bactérias: A) <i>X. albilineans</i> , B) <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , C) <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> , D) <i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> , E) <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>	40
Figura 13 - Inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos de cana-de-açúcar pela presença de substâncias antagônicas produzidas por <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5) 1- induzida pelo tratamento com H ₂ O ₂ ; 2- sem o tratamento com o indutor, 3- controle sem <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5) 1- induzida pelo tratamento com H ₂ O ₂ ; 2- sem o tratamento com o indutor, 3- controle sem <i>G. diazotrophicus</i> . A) <i>Colletotricum falcatum</i> , B) <i>Fusarium moniliforme</i>	41
Figura 14 - Inibição do crescimento do fungo fitopatogênico de tomate, <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>lycopersici</i> , pela presença de substâncias antagônicas produzidas por <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5) 1- induzida pelo tratamento com H ₂ O ₂ ; 2- sem o tratamento com o indutor, 3- controle sem <i>G. diazotrophicus</i> . A) Raça 1; B) Raça 2; C) Raça 3.....	41
Figura 15 - Efeito da incubação com 1- gluconacina (0,5 µg/µL) e 2- controle (tampão de eluição), sobre bactérias sensíveis e resistentes. A) <i>X. albilineans</i> B) <i>H. seropedicae</i> HRC54.	44
Figura 16 - Efeito bactericida da gluconacina sobre a bactéria <i>X. albilineans</i>	46
Figura 17 - Contagem de células viáveis de <i>X. albilineans</i> após 15 minutos de incubação com a) controle e b) gluconacina.....	47
Figura 18 - Efeito da gluconacina sobre a estrutura celular de <i>X. albilineans</i> . Células tratadas com (A) tampão de eluição (controle); (B) gluconacina.	48
Figura 19 - Materiais extracelulares absorventes de UV de células de <i>X. albilineans</i> detectados a 260 nm (● – controle; ○- gluconacina) e 280nm (◆ - controle; ◇ - gluconacina) 48	48
Figura 20 - Concentração de fosfato inorgânico intracelular (▼- controle; △- gluconacina) e extracelular (●- controle; ○- gluconacina) de células de <i>X. albilineans</i>	49
Figura 21 - Micrografias confocal de varredura a laser de células de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> incubadas incubadas sem (A-C) e com gluconacina (B-D) por 4 e 24 horas	51
Figura 22 - Plantas de tomate aos 20 dias após a inoculação com o patógeno <i>R. solanacearum</i> , estirpe 292. A) Planta assintomática B) Desenvolvimento de raízes adventícias	54
Figura 23 - Colônias originadas da exsudação de explantes de plantas inoculadas com <i>R. solanacearum</i> , estirpe 292, em meio Kelman com tetrazólio.	55
Figura 24 - Eficácia da aplicação de gluconacina na redução de lesões (setas) causadas pelo patógeno <i>X. perforans</i> , estirpe 2370. A) planta tratada; B) planta não tratada (controle).....	57
Figura 25 - Variação na severidade da mancha bacteriana causada por <i>X. perforans</i> (estirpe 2370) em plantas inoculadas e tratadas com tampão de eluição (controle), gluconacina e não inoculadas com o patógeno (controle negativo)	57

- Figura 26** - Área abaixo da curva de progresso da doença mancha-bacteriana de plantas tratadas com gluconacina, tampão de eluição (controle 1), solução salina (controle 2). NL- nº de lesões; FLS- porcentagem de folhas sintomáticas; FOL- porcentagem de folíolos sintomáticos.....58
- Figura 27** - Evolução da doença mancha-bacteriana ao longo de 16 DAI. Avaliações feitas segundo: A) Número de lesões; B) nº de folhas sintomáticas e C) nº de folíolos sintomáticos. Tratamento com : ● – gluconacina; ○ – controle (tampão de eluição).....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Microrganismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana.....	12
Tabela 2- Tratamentos correspondentes a alterações de imidazol nos tampões de ligação e de lavagem L2	17
Tabela 3 - Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das eluições de gluconacina recombinante obtidas sob diferentes concentrações de imidazol nos tampões de ligação e de lavagem.....	37
Tabela 4- Inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos pela presença de substâncias antagônicas produzidas por <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5) induzida ou não pela adição de H_2O_2	40
Tabela 5 - Espectro inibitório da gluconacina contra bactérias de importância para a cultura canavieira e tomaticultura.....	43
Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória de gluconacina para as bactérias fitopatogênicas de cana-de-açúcar e tomate.....	45
Tabela 7 - Efeitos de pH, enzimas, surfactantes e temperatura sobre a atividade antibacteriana da gluconacina	52
Tabela 8 - Severidade (AACPD) da mancha-bacteriana em tomateiros tratados com gluconacina, tampão de eluição (controle 1) e solução salina (controle 2).....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 A cana-de-açúcar	4
3.1.1 Doenças de importância econômica para a cultura canavieira	5
3.2 Tomaticultura	7
3.2.1 Doenças de importância econômica para a tomaticultura	8
3.3 Potencial biotecnológico da bactéria diazotrófica <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	10
3.4 Bacteriocinas e sua aplicação na agricultura	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Microrganismos e condições de crescimento	12
4.2 Condições de expressão da gluconacina recombinante	14
a) Temperatura de cultivo e tempo de indução da estirpe recombinante	14
b) Avaliação de meios de cultivo	15
c) Avaliação de cultivo realizado em agitador e biorreator	15
4.3 Purificação e quantificação da gluconacina recombinante	16
4.3.1 Seleção da metodologia de purificação	16
a) Otimização da purificação conforme alterações nas concentrações de imidazol (recomendações do fabricante da coluna His Gravitrap) – Protocolo A	16
b) Protocolo B.....	16
b.1) Otimização da concentração de imidazol no processo de purificação	17
4.3.2 Quantificação da bacteriocina gluconacina purificada	17
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	18
4.5 Bioensaios para avaliação da atividade antimicrobiana de <i>G. diazotrophicus</i>	18
4.5.1 Indução da produção de substâncias antimicrobianas de <i>G. diazotrophicus</i> por H ₂ O ₂ ..	18
a) Avaliação contra bactérias.....	18
b) Avaliação contra fungos.....	19
4.6 Avaliação do espectro de atuação da bacteriocina gluconacina	19
4.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da gluconacina contra fitopatógenos	20
4.7 Caracterização do efeito antimicrobiano da gluconacina	20
4.7.1 Avaliação do efeito da gluconacina sobre a viabilidade de <i>X. albilineans</i> - Curva de letalidade.....	20
4.7.2 Determinação do mecanismo de ação	20

a) Avaliação da alteração da morfologia celular	20
b) Avaliação de permeabilidade e integridade da membrana celular	21
b.1) Análises de microscopia confocal de varredura a laser.....	21
4.7.3 Caracterização físico-química da gluconacina	22
a) Efeitos de temperatura	22
b) Efeitos de pH.....	22
c) Efeitos de surfactantes	22
d) Efeitos de enzimas proteolíticas e glicolíticas.....	22
4.8 Ensaio de biocontrole sob condições de casa de vegetação.....	23
4.8.1 Desinfestação e germinação das sementes	23
4.8.2 Ensaio de proteção de mudas contra murcha-bacteriana e avaliação da severidade da doença.....	23
4.8.3 Ensaio de proteção de mudas contra mancha bacteriana e avaliação da severidade da doença.....	23
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Otimização da expressão da gluconacina recombinante	25
b) Avaliação de meios de cultivo	29
c) Avaliação de cultivo realizado em frascos, sob agitação e em biorreator.....	31
5.2 Purificação e quantificação da gluconacina recombinante.....	33
5.2.1 Seleção da metodologia de purificação da gluconacina	33
a) Otimização da purificação conforme alterações nas concentrações de imidazol (recomendações do fabricante da coluna His Gravitrap) – Protocolo A	33
b) Protocolo B.....	34
b.1) Otimização das concentrações de imidazol no processo de purificação	36
5.3 Bioensaios para avaliação da atividade antimicrobiana produzida por <i>G. diazotrophicus</i>	38
5.3.1 Indução da produção de substâncias antimicrobianas de <i>G. diazotrophicus</i> por H ₂ O ₂	38
a) Avaliação contra bactérias fitopatogênicas e benéficas	38
5.4 Espectro de atuação da bacteriocina gluconacina.....	42
5.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI)	45
5.6 Caracterização do efeito antimicrobiano da gluconacina	46
b.1) Análises de microscopia confocal	50
5.6.1 Caracterização físico-química da gluconacina	52
5.7 Ensaio de biocontrole sob condições de casa de vegetação.....	54
5.7.1 Proteção de mudas de tomateiro contra murcha-bacteriana (<i>R. solanacearum</i>)	54
5.7.2 Proteção de mudas de tomate contra mancha-bacteriana (<i>X. perforans</i>)	56
6 CONCLUSÕES.....	61
7 PERSPECTIVAS.....	62
8 REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria Gram negativa fixadora de nitrogênio, inicialmente isolada por Cavalcante e Döbereiner (1988) de tecidos internos de plantas de cana-de-açúcar brasileiras. Posteriormente, também foi relatado seu isolamento de plantas de diversas outras culturas como: abacaxi (TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2000), batata doce (*Ipomoea batatas*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (CABALLERO-MELLADO et al., 1995), capim-pé-de-galinha-gigante (*Eleusine coracana*) (LOGANATHAN et al., 1999), rizosfera de café (*Coffea arabica*) (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997) e tomate (MADHAIYAN et al., 2004).

Este endófito possui reconhecido potencial para fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios, como o ácido indol acético (PATIL et al., 2011; MUÑOZ-ROJAS et al., 2009; FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993) e giberilinas (BASTIAN et al., 1998), sendo caracterizado como uma bactéria promotora do crescimento vegetal.

Além disso, possui capacidade de proteção aos hospedeiros contra estresses abióticos, como déficit hídrico (FILGUEIRAS, 2015; VARGAS et al., 2014; BEZERRA, 2014), e bióticos, através da indução de mecanismos de defesa ou pela produção de substâncias antagônicas ao crescimento de diversos patógenos (DRECHSEL, 2011; MUÑOZ-ROJAS et al., 2005; PIÑON et al., 2002). As bactérias produzem e excretam uma grande diversidade de compostos usados como mecanismo de defesa, mediando assim a dinâmica da população local. Tais compostos podem ter síntese não ribossomal, incluindo uma ampla variedade de antibióticos, enzimas líticas, exotoxinas e subprodutos, ou ribossomal, envolvendo a síntese de peptídeos como componente principal do sistema de defesa do hospedeiro.

Dentre esses compostos, destacam-se as bacteriocinas (SUBRAMANIAN e SMITH, 2015). Esses peptídeos antimicrobianos possuem potencial de aplicação em diversas áreas, e no viés da agricultura, após a identificação da agrocina 84 por Cooksey e Moore (1982), o enfoque em pesquisas voltadas à descoberta de bacteriocinas com atividade antagônica contra fitopatógenos (PRÍNCIPE et al., 2018; FERNANDEZ et al., 2017; NAZ et al., 2015) e seu impacto sobre os demais microrganismos cresce continuamente (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005).

Pragas e agentes fitopatogênicos representam uma ameaça significativa para a agricultura (FISHER et al., 2012; FLOOD, 2010; STRANGE e SCOTT, 2005). As perdas globais causadas por organismos patogênicos giram em torno de 20% a 40% (FLOOD, 2010; OERKE, 2006). Para o agronegócio brasileiro, a perda média anual é de até 7,7% da produção, o equivalente a 25 milhões de toneladas de alimentos perdidas em função de pragas (SUGAYAMA et al., 2015).

Dentre essas estimativas de perdas na produção, a cultura canavieira e a tomaticultura apresentam índices significativos. Para a produção de tomates, apesar de não haver mensuração oficial, sabe-se que a redução na produção pode alcançar níveis críticos dependendo da doença. Enquanto para a produção de cana-de-açúcar, essa redução pode chegar a 25% (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Ambas as culturas são de grande importância econômica, colocando o país em destaque dentre os demais produtores. Com uma produção crescente, o Brasil lidera o ranking do agronegócio canavieiro, produzindo duas vezes mais que a Índia, segundo maior produtor. Na tomaticultura o país ocupa o nono lugar na produção mundial e o primeiro lugar em relação aos países da América do Sul (FAO, 2016).

Dessa forma, visando minimizar as perdas e aproximar a produção do potencial máximo de cada cultura, torna-se cada vez mais necessária a utilização de métodos de controle de pragas mais eficazes. E é nesse contexto que o controle biológico vem merecendo

destaque como uma alternativa ambientalmente amigável (DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018; DURAIRAJ et al., 2018; CHOWDHURY et al., 2015). A bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus* tem sido proeminente em pesquisas desse ramo (NIETO-PEÑALVER et al., 2014; LOGESHWARN, THANGARAJU e RAJASUNDARI, 2011). Por ocupar o mesmo nicho que vários patógenos, sua capacidade de controle pode ocorrer de várias formas: competição por espaço e/ou nutrientes, indução de resistência do hospedeiro e produção de compostos antimicrobianos (SAHARAN e NEHRA, 2011)

Nessa temática, após o sequenciamento completo do genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* (BERTALAN et al, 2009), nossa equipe iniciou uma investigação dos dados, levando à identificação de um gene (GDI_0415) associado à síntese de uma bacteriocina semelhante à linocina M18, produzida por *Brevibacterium linens* (VALDÉS-STAUER e SCHERER, 1994). Nos trabalhos desenvolvidos por Dreschel et al. (2010), através da produção de mutantes defectivos para a síntese da bacteriocina, foi demonstrado que o gene GDI_0415 é o responsável pela produção do peptídeo antimicrobiano que demonstrou atividade antagonista *in vitro* contra *Xanthomonas albilineans*. Posteriormente, Oliveira (2013) deu prosseguimento aos estudos com a clonagem do gene GDI_0415 e produção heteróloga da bacteriocina, denominada de gluconacina, em células de *E.coli*.

Em continuidade a esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo investigar as melhores condições para produção e purificação da bacteriocina gluconacina recombinante e realizar sua caracterização físico-química. Além disso, foram feitas avaliações do espectro de atuação desse peptídeo antimicrobiano sobre microrganismos fitopatogênicos ou não para plantas de cana-de-açúcar e tomate, e investigações do mecanismo de ação sobre os patógenos antagonizados. Por fim, a ação da gluconacina foi confirmada em experimentos realizados em casa de vegetação em plantas de tomate infectadas com o patógeno *Xanthomonas perforans*, agente causal da mancha-bacteriana.

HIPÓTESE

A bacteriocina gluconacina produzida pela bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe PAL5, possui potencial antagônico contra microrganismos de importância agrícola para as culturas de cana-de-açúcar e tomate.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as melhores condições para a produção e purificação da bacteriocina recombinante gluconacina e, avaliar seu potencial antagônico contra microrganismos de importância agrícola para as culturas de cana-de-açúcar e tomate.

2.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer a condição ótima de cultivo da estirpe portadora do vetor de expressão da bacteriocina gluconacina recombinante [*E. coli* estirpe BL21AI (p17GDI0415)], e determinar as melhores condições para a sua purificação por cromatografia de afinidade.
2. Avaliar *in vitro* o espectro de atuação desse peptídeo antimicrobiano frente a microrganismos de importância agrícola para as culturas de cana-de-açúcar e tomate.
3. Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de *G. diazotrophicus* sobre bactérias e fungos fitopatogênicos de importância para as culturas de cana-de-açúcar e tomate.
4. Realizar a caracterização físico-química da bacteriocina gluconacina.
5. Determinar o mecanismo de ação da bacteriocina gluconacina sobre os microrganismos antagonizados.
6. Validar a atividade antimicrobiana da bacteriocina gluconacina em plantas de tomate infectadas com fitopatógeno selecionado, em condições de casa de vegetação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, pertencente ao gênero *Saccharum*, família *Poaceae*. Sua origem foi determinada no sudeste da Ásia, nas regiões compreendidas entre a Indonésia e Nova Guiné (MOZAMBANI et al, 2006). A cana-de-açúcar cultivada no Brasil é derivada de hibridação entre as espécies *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis* e *S. edule*. A espécie *S. officinarum* é empregada como base para o melhoramento genético no país, em função da sua capacidade de acumular elevados índices de sacarose no colmo, no entanto possui baixa resistência a doenças. Já a espécie *Saccharum spontaneum* é usada como repositório de genes de perfilhamento, resistência, vigor e capacidade de rebrota para as novas variedades (SCARPARI e BEAUCLAIR, 2010)

O agronegócio canavieiro possui incontestável importância para a economia do Brasil, que atualmente lidera a produção mundial, seguido por Índia e China (FAO, 2016). Apesar da relevância da produção de açúcar, que dá destino a 273,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar produzidas, o principal propulsor do setor é o álcool, com 352,4 milhões de toneladas de cana destinadas à produção (CONAB, 2018). Essa demanda é reflexo da crescente preocupação das economias mundiais com a dependência relacionada com o uso de combustíveis fósseis. Além disso, o etanol é uma das melhores alternativas para reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa, posto que sua queima como combustível diminui em 70% a emissão de CO₂ na atmosfera em relação à gasolina (SOARES et al., 2009)

Apesar destes altos índices de produção, a produtividade brasileira (~75 ton/ha) ainda está abaixo do potencial agrônomo da planta e dentre as causas da diminuição do potencial de produção, pode ser destacada a deficiência nutricional de nitrogênio e o ataque de fitopatógenos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Alguns fatores propiciam o aparecimento e disseminação das doenças: A época de cultivo é um deles – o cultivo da cana-de-açúcar normalmente é realizado entre abril e setembro. Neste período as plantas estão mais suscetíveis ao surgimento de pragas devido às condições edafoclimáticas (SEGATO et al., 2006). Além disso, o plantio e a colheita normalmente são mecanizados, favorecendo a disseminação das doenças. A estimativa das perdas geradas por fitopatógenos está entre 10% e 25% (DINARDO-MIRANDA et al., 2010)

3.1.1 Doenças de importância econômica para a cultura canavieira

A cultura canavieira é atingida mundialmente por diversos tipos de doenças. Algumas delas possuem importância econômica para determinada região ou país, em função do impacto direto ou por constituir uma ameaça (MATSUOKA e MACCHERONI, 2012). O controle de doenças mais efetivo em cana-de-açúcar é determinado pela resistência genética das variedades criadas pelos programas de melhoramento (LANDELL; SILVA, 2004).

Como é improvável a obtenção de um híbrido que reúna a resistência a todas as doenças e ainda possua características agroindustriais desejáveis, o controle das doenças por meio de variedades resistentes torna-se também um gargalo, uma vez que sempre surgirá em cultivo variedades suscetíveis a algumas doenças. Assim, são estabelecidas prioridades de acordo com a importância econômica de cada doença por região e época de plantio, de modo que as variedades selecionadas tenham como uma das suas características a resistência para as doenças mais importantes (SANGUINO, 2012).

No Brasil, foram relatadas 40 das 177 doenças verificadas em cana-de-açúcar (SANTOS, 2005). A seguir são listadas algumas de maior importância para o setor sucroalcooleiro nacional:

- **Estria Vermelha** – tem a Ásia como centro de origem e atualmente é disseminada mundialmente. O primeiro relato no Brasil ocorreu em Campos dos Goytacazes (RJ) em 1932. Apesar de ter distribuição restrita no país, a doença tem considerável relevância em função do seu grande impacto econômico em São Paulo e Paraná, onde os solos de alta fertilidade favorecem o desenvolvimento do patógeno (MATSUOKA e MACCHERONI, 2012). Além disso, com a expansão dos canaviais para locais mais quentes, associada com uma melhoria da fertilidade do solo, sérios prejuízos podem ser causados, visto que algumas variedades disponíveis não possuem resistência satisfatória (SANGUINO, 2012).

O agente causal da estria vermelha é a *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, uma bactéria baciliforme com 0,6-0,8 x 1,5-1,9 µm de tamanho e Gram negativa. Suas colônias são circulares, com bordas lisas e coloração que pode variar de creme a amarelo em meio de cultivo Nutriente ágar e YDC (FONTANA et al., 2013). A sintomatologia da doença envolve: (1) estrias foliares – inicialmente surgem estrias encharcadas, que em seguida tornam-se vermelho-amarronzadas. Em variedades suscetíveis, estas estrias podem alcançar o meristema apical e a infecção se torna sistêmica, produzindo o outro sintoma: podridão do colmo. (2) Podridão do colmo – a característica de podridão é decorrente da morte dos tecidos. Com a evolução do quadro, a podridão se estende por todo colmo, podendo causar rachaduras por onde escorre o líquido resultante da decomposição dos tecidos da planta (ALMEIDA, 2008).

O controle mais efetivo da doença é evitar a utilização de variedades suscetíveis em condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, e em casos da utilização de tais variedades, o cultivo deve ser feito em solos de baixa fertilidade e com adubação limitada. Como a bactéria possui altos índices de sobrevivência nos restos culturais, deve-se evitar a implantação de viveiros em áreas que foram afetadas pela doença (MATSUOKA e MACCHERONI, 2012).

- **Falsa estria vermelha (FEV)** – sua ocorrência, até o momento, foi relatada apenas no Brasil, onde foi inicialmente identificada em 1999. Possui disseminação por toda região canavieira do centro-sul do país. O nome da doença é devido à dificuldade de se diferenciar seus sintomas daqueles causados por *A. avenae* subsp. *avenae*, agente causal da estria vermelha (GIGLIOTTI; MATUOKA, 2000). O agente etiológico é a bactéria *Xanthomonas* sp.

Os sintomas se caracterizam como estrias finas de 1mm de largura e comprimento variável, paralelas à nervura central, de coloração vermelho-escuro, mas contra a luz tornam-se translúcidas, amareladas. Esta última característica é um dos pontos diferenciáveis à estria vermelha, juntamente com a intensa exsudação bacteriana branca na face inferior da folha. Plantas sintomáticas para FEV têm uma redução drástica da capacidade fotossintética, podendo conseqüentemente reduzir a produção de colmos por hectare (MATSUOKA, 2013). O controle mais efetivo consiste na utilização de variedades resistentes à doença.

- **Escaldadura das folhas** – essa importante doença de cana-de-açúcar foi relatada pela primeira vez na Indonésia e na Austrália, na década de 1920, e hoje é disseminada em todas as regiões produtoras do mundo. Sua ocorrência no Brasil foi descrita em 1943, no estado de São Paulo (MATSUOKA e MACCHERONI, 2012). O agente causal é a bactéria Gram-negativa *X. albilineans*.

As variedades comerciais apresentam tolerância e podem ser portadoras do patógeno sem apresentar sintomas. Assim a distribuição do patógeno é generalizada por todo o país. Porém, a doença é altamente dependente das condições ambientais, e quando ocorrem condições de estresse para a planta, ela pode manifestar-se causando prejuízos elevados (CHAMPOISEAU et al., 2009).

A doença manifesta-se de duas formas: (1) Fase crônica – o limbo foliar apresenta estrias estreitas e brancas, podendo atingir o comprimento total da folha e se prolongar pela bainha. Com o avanço da doença, as estrias podem se expandir, evoluindo para clorose em diversos graus, dando assim, aparência de folha escaldada. Devido à clorose, há comprometimento fotossintético, paralisação do crescimento do broto apical ou deterioração do ápice da planta. (2) Fase aguda – as plantas infectadas murçam e morrem como se estivessem em condição de estresse hídrico (ALMEIDA, 2008). A forma mais efetiva de controle vem da utilização de variedades resistentes ao patógeno, aliada à produção de mudas com alta sanidade (MATSUOKA; MACCHERONI, 2012).

- **Gomose** – é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. Foi observada no Brasil pela primeira vez em 1863, na Bahia e mais tarde em Pernambuco, causando grandes prejuízos (SAUMTALLY; DOOKUN-SAUMTALLY, 2004).

As plantas infectadas apresentam estrias avermelhadas ao longo do comprimento das folhas. Em variedades mais suscetíveis, as estrias podem atingir o colmo, tornando-se sistêmicas. Neste caso, são muito semelhantes àquelas da doença estria vermelha. No entanto, o sintoma mais importante é a liberação de um exsudato denominado goma. O caldo extraído de colmos com goma causam grandes problemas no processo de obtenção do açúcar como: dificuldade na moagem dos colmos, interferência na clarificação do caldo e no processo de evaporação (ALMEIDA, 1994).

Nos países onde a doença é problema, é proibido o plantio de variedades suscetíveis. Nestes países, já foram relatadas grandes perdas, inviabilizando a colheita de talhões inteiros. Além disso, há perdas indiretas, posto que as variedades que têm o plantio proibido normalmente são mais ricas em açúcar que as resistentes para a doença (ALMEIDA, 2008).

- **Podridão vermelha** - esta é umas das principais doenças da cultura de cana-de-açúcar, sendo relatada em várias partes do mundo. Tem como agente causal o fungo *Colletotrichum falcatum*. São vinculadas grandes perdas a essa doença, isso quando encontra-se associada à infestação da cultura por broca da cana (*Diatraea saccharalis*). Quando isso ocorre, pode ocorrer a inversão da sacarose, podendo atingir até 70% de redução em seu teor (MATSUOKA; MACCHERONI, 2012).

A sintomatologia principal da doença é a podridão do colmo, tornando-o de cor avermelhada. Ocorrem lesões de cor vermelha intensa na nervura central das folhas, que com o tempo tornam-se esbranquiçadas. Esta característica é fundamental no diagnóstico, uma vez que várias doenças apresentam em comum o avermelhamento dos tecidos (SANGUINO, 2012). O uso de variedades resistentes é o modo de controle mais efetivo e utilizado. Boas práticas culturais ajudam a reduzir a incidência da doença, como a eliminação dos restos da cultura (fonte de inóculo), boa drenagem do solo e boa procedência de mudas, que garantam a rápida germinação dos toletes (MATSUOKA; MACCHERONI, 2012).

- **Podridão do *Fusarium*** – Esta doença tem como agente etiológico o fungo *Fusarium moniliforme*. Os sintomas envolvem o avermelhamento contínuo e intenso dos tecidos internos do colmo, sem apresentar ilhas brancas. A doença normalmente está relacionada a injúrias físicas, químicas e, principalmente, a perfurações provocadas pela broca da cana. Também são relatadas murcha e morte dos colmos e, diferentemente de sintomas semelhantes, causados por podridão-abacaxi, não exala cheiro nenhum (MATSUOKA, 2013).

O fungo *Fusarium moniliforme* também pode causar o sintoma de Pokka Boeng, que consiste no desenvolvimento de regiões cloróticas na base das folhas novas, acompanhadas com uma distorção e encurtamento da folha. As plantas apresentam o “cartucho” foliar distorcido, com folhas cloróticas curtas, apresentando nestas regiões cloróticas, pequenas estrias avermelhadas. Os sintomas da doença são bastante confundidos com a deficiência de boro e podem, na maioria das vezes, estarem ligados a este fator (SANGUINO, 2012). O controle mais efetivo da doença é a utilização de variedades resistentes ao fungo.

3.2 Tomaticultura

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma solanácea que tem como centro de origem as regiões Andinas (PERALTA e SPOONER, 2007). É uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no mundo em termos de seu consumo no estado bruto ou através de preparações industriais. A produção global de tomate vem aumentando nos últimos anos. Noventa por cento do fornecimento mundial é feito por dez países, sendo o maior produtor a China, seguido da Índia (FAO, 2016). Nesse classificação, o Brasil ocupa a nona posição e o primeiro lugar em relação aos países da América do Sul, com uma produção de 4,5 milhões de toneladas, e aumento de 3,5% com relação à safra de 2017 (IBGE, 2018).

Com uma produção dividida em dois grandes grupos: “tomate rasteiro”, de uso industrial, e “tomate estaqueado”, voltado ao consumo *in natura*, a produção nacional concentra-se em Goiás (30,7%) e São Paulo (20,4%) (IBGE, 2018). Apesar dos bons números, um dos grandes entraves à produção brasileira, entre outros fatores tecnológicos, é a grande suscetibilidade da cultura a pragas e doenças. Um grande número de patógenos infecta o tomateiro, causando perdas consideráveis em produtividade e qualidade, refletindo conseqüentemente, no custo da produção. Devido a isso, a tomaticultura é uma das culturas hortícolas de maior complexidade agrônômica, podendo originar um elevado custo e risco econômico (FILGUEIRA, 2008).

A principal forma utilizada para o controle de doenças é a aplicação de defensivos agrícolas, gerando gastos em torno de US\$116.984 milhões (SINDAG, 2011). Além do dano econômico, o uso indiscriminado de agrotóxicos acarreta uma série de riscos à saúde e conseqüências ambientais, como a contaminação de lençóis freáticos e desequilíbrio de ecossistemas (BELCHIOR et al., 2014).

A conscientização em torno dessas implicações tem alavancado a busca por formas alternativas de controle de doenças, e uma série de avanços têm sido demonstrados, como:

indução de resistência através do uso de componentes químicos (NAIR et al., 2015; PYE et al. 2013) e de microorganismos (HOUSSEIN, AHMED e ISMAIL, 2010), incluindo fungos micorrízicos (ZHU et al. 2004) e bactérias antagonistas (ROCHA et al., 2017; CHEN et al., 2012), aplicação de extratos de plantas (NASHWA et al., 2012; BALBI-PEÑA et al., 2006) e bacteriocinas (PRÍNCIPE et al., 2018).

3.2.1 Doenças de importância econômica para a tomaticultura

Conforme mencionado anteriormente, a cultura do tomateiro pode ser afetada por um grande número de doenças e distúrbios fisiológicos durante todas as fases de desenvolvimento. Abaixo são listadas algumas das doenças fúngicas e bacterianas de maior impacto sobre a cultura:

- **Murcha bacteriana** – É uma das principais doenças do tomateiro e de outras solanáceas em países de clima tropical e subtropical. Essa bacteriose causada por *Ralstonia solanacearum* tem grande impacto em todas as regiões do país, sobretudo na região norte, onde é fator limitante à produção na maior parte do ano (LOPES, 2009). O aparecimento da murcha bacteriana é favorecido por altas temperaturas e umidade do solo. Por isso ocorre em maior intensidade ao longo de cultivos de verão chuvoso. O sintoma mais característico é o murchamento da planta de cima para baixo, resultado da interrupção parcial ou total do fluxo de água. Esse processo de obstrução ocorre devido à multiplicação do patógeno, que juntamente com a alta produção de exsudatos viscosos, acabam entupindo o xilema (LOPES, 2007). Em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, em poucos dias a murcha atinge toda a planta (LOPES e AVILA, 2005).

O controle da murcha-bacteriana é bastante laborioso, visto que não existem cultivares com alta resistência à doença. São requeridas várias medidas integradas e complementares como: evitar o plantio em áreas com histórico da doença, realizar o cultivo em terrenos com solos bem drenados, evitar o plantio em épocas de temperatura e umidade altas, evitar irrigações frequentes e realizar rotação de culturas (LOPES, 2009).

- **Mancha-bacteriana** – Atualmente, são conhecidas quatro espécies do gênero *Xanthomonas* que podem ocasionar manchas foliares no tomateiro: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*. Esta doença possui ampla distribuição pelo mundo. Seu aparecimento é favorecido por temperaturas entre 20 e 30°C, sendo mais severa em locais onde ocorrem chuvas associadas a ventos fortes e a terrenos arenosos (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2009).

A doença se manifesta inicialmente em folhas mais velhas sob a forma de manchas marrons ou pretas com tamanho de até 3 mm de diâmetro, podendo apresentar halo amarelado. Em seguida as manchas podem tornar-se necróticas e em alguns casos, folhas inteiras ficam amareladas (BLANCARD, 2012). Sob alta umidade do ar ou em presença do orvalho, as lesões ficam com aspecto encharcado. Sob alta infestação, as lesões coalescem e ocorre a secagem das folhas expondo os frutosa queima pelo sol. As manchas podem aparecer também no pecíolo, no caule, nas partes florais e nos frutos.

A mancha-bacteriana é uma doença de difícil controle, visto que não existem cultivares com alta resistência ao patógeno. Até o momento, é feita a aplicação de bactericidas à base de cobre (QUEZADO-DUVAL e LOPES, 2010). Entretanto, sua eficiência vem decrescendo devido ao surgimento de estipes tolerantes (BEHLAU et al., 2013). Em função disso, é recomendada a adoção de boas práticas como: utilizar mudas e sementes com alta sanidade,

plantar em áreas bem ventiladas e pouco sujeitas à formação de orvalho, evitar irrigação por aspersão, fazer rotação de culturas, de preferência com gramíneas (LOPES e AVILA, 2005).

- **Pinta bacteriana** – *Pseudomonas syringae* é o agente causal dessa doença, também conhecida como mancha bacteriana pequena. Essa bacteriose tem maior importância em regiões de temperatura mais amena (18 a 25°C) e alta umidade relativa (LOPES e QUEZADO-DUVAL, 2009). No processo de infecção, primeiramente *P. syringae* pv. *tomato* coloniza a filosfera e em seguida passa para uma fase endofítica (HIRANO e UPPER, 2000). Os sintomas são observáveis em todos os órgãos da parte aérea da planta, sendo primeiramente notados nas folhas mais velhas, sob a forma de manchas arredondadas de coloração marrom-escura. Em lesões mais antigas, é comum aparecer um halo amarelado. As manchas necróticas podem se juntar, abrangendo assim, grandes áreas (LOPES; DUVAL, 2009).

O controle consiste na utilização de cultivares resistentes, utilização de mudas e sementes de boa qualidade, evitar irrigação por aspersão e aplicação de fungicidas à base de cobre e antibióticos registrados (LOPES; AVILA, 2005).

- **Murcha-de-fusário** – essa doença fúngica é ocasionada pelo *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*. Esse fungo é agrupado em três raças fisiológicas: raças 1, 2 e 3, sendo essa classificação dependente das habilidades que o fungo apresenta em infectar e causar a doença em uma série de cultivares que possuem genes em diferentes *loci* de resistência (SOUZA et al. 2010). A doença é favorecida por temperatura alta e solos ácidos e arenosos.

O sintoma mais evidente da murcha-de-fusário é o amarelecimento das folhas mais velhas, seguido de murcha da planta (LOPES e DUVAL, 2009). Os sintomas iniciais podem incluir o amarelecimento e a murcha de um lado da planta ou da folha correspondente ao local onde a infecção vascular se desenvolve. O escurecimento dos tecidos vasculares infectados é mais intenso na base do caule e é uma característica marcante, embora não seja exclusiva da doença (LOPES e AVILA, 2005).

O controle consiste na utilização de cultivares mais resistentes, plantio de mudas e sementes de boa qualidade, fazer a correção de acidez do solo mantendo o pH em torno de 6,5, realizar o plantio em terreno com boa drenagem (LOPES; DUVAL, 2009).

3.3 Potencial biotecnológico da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Diversas espécies de bactérias já foram isoladas de tecidos de cana-de-açúcar, dentre elas, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (OLIVARES et al, 1996), espécies do gênero *Azospirillum* e *Paraburkholderia* (REIS et al., 2004). Em 1988, Cavalcante e Döbereiner reportaram o isolamento da bactéria ácido-tolerante, fixadora de nitrogênio, *Saccharobacter nitrocaptans*.

Gillis et al. (1989), através de estudos moleculares e fisiológicos, reclassificaram a mesma como *Acetobacter diazotrophicus*, e em 1998, Yamada et al., baseados em análises de sequências do gene para a subunidade 16S do RNAr, renomearam a bactéria para *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Maior enfoque foi dado às pesquisas envolvendo tal microrganismo, quando foi verificada sua grande contribuição de N para a planta à qual está associada. Segundo Urquiaga et al (2012), o nitrogênio proveniente da FBN pode contribuir com aproximadamente 60% de todo N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar.

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi descrita como Gram negativa, microaeróbica, com capacidade de crescer em pH's ácidos e formar ácido acético a partir de etanol. Cresce em altas concentrações de sacarose (10%) e tem habilidade de excretar o nitrogênio fixado (MUTHUKUMARASAMY, et al., 2002).

A cana-de-açúcar não é a única hospedeira dessa bactéria. Outros autores já verificaram sua ocorrência em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), café (*Coffea arabica*), abacaxi (PERIN, et al., 2004), batata-doce (*Ipomoea batatas*) (DONG, et al.1995), tomate (MADHAIYAN et al., 2004), banana e arroz (MUTHUKUMARASAMY, et. al, 2005), ampliando assim o seu potencial de utilização em diversas culturas.

A associação da *G. diazotrophicus* com plantas de cana-de-açúcar é foco de várias pesquisas, visto que os benefícios trazidos por ela são de interesse agrícola (VARGAS et al., 2014; PERIN, BALDANI e REIS, 2004; PIÑON et al., 2002). Além da capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, esta bactéria é capaz de promover o crescimento vegetal através da produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos minerais, aumento da permeabilidade das raízes, produção de sideróforos ou outros nutrientes do solo e supressão de doenças através da atividade antagônica contra fitopatógenos (ESKIN, VESSEY e TIAN, 2014).

Essa última característica tem sido avaliada por diversos autores, sendo observado potencial antagônico contra uma série de organismos de importância agrícola: *Colletotrichum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY et al, 2000), *X. albilineans* (NIETO-PEÑALVER et al, 2014; OLIVEIRA, 2013; DRECHSEL, 2011; ARENCIBIA et al., 2006; BLANCO et al., 2005; PIÑON et al., 2002), *Meloidogyne incognita* (BANSAL et al, 2005), *Fusarium oxysporum* (LOGESHWARN et al, 2011), *X. campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (NIETO-PEÑALVER et al, 2014). Entretanto, o componente responsável pela atividade antagônica não foi bem identificado ou caracterizado (MUTHUKUMARASAMY et al, 2000; ARENCIBIA et al, 2006; MUÑOZ-ROJAS et al, 2005).

Nos trabalhos realizados por Piñon et al (2002), Muñoz-Rojas et al., (2005), Blanco et al., (2005) e Drechsel (2011), a atividade antagônica de *G. diazotrophicus* foi atribuída a produção de bacteriocinas. Esses peptídeos antimicrobianos têm sido apresentados como alternativa promissora em controle biológico, seja na forma de formulações ou produção *in situ*. Em bactérias Gram-negativas, a produção de bacteriocinas é vinculada a um fator indutor. Essa indução ocorre em condições de estresse, como demonstrado em Piñón *et al.* (2002) e Drechsel *et al.* (2010). Para superar essa barreira, uma alternativa interessante seria utilizar a *G. diazotrophicus* como vetor de expressão heteróloga, conforme demonstrado por Salles et al. (2000) e Subashini et al. (2010) para genes cry que possuem atividade entomopatogênica a insetos.

3.4 Bacteriocinas e sua aplicação na agricultura

As bactérias produzem e excretam uma grande variedade de compostos que possuem grande influência sobre a modulação da dinâmica da população local e estão ligados a defesa das plantas contra patógenos. Tais compostos podem ser originados de síntese não ribossomal (antibióticos, exotoxinas, subprodutos metabólicos) e ribossomal – bacteriocinas (SUBRAMANIAN e SMITH, 2015). As bacteriocinas são peptídeos bioativos que possuem ação antagonista contra uma grande diversidade de microrganismos, incluindo bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos (VAUGHAN et al. 2003). Essa última característica faz com que grande parte do enfoque nas pesquisas desses peptídeos antimicrobianos seja dado à área de conservação de alimentos (BALCIUNAS et al, 2013). Entretanto, o avanço nas pesquisas tem demonstrado um grande potencial de aplicação nas mais diversas áreas.

Na agricultura, o enfoque das pesquisas envolvendo a aplicação das bacteriocinas tem sido no controle de fitopatógenos (TONTOU et al., 2016; SUBRAMANIAN; SMITH, 2015; MOULOUD et al., 2013). O composto de aplicação agrícola, melhor caracterizado é a agrocina 84. Esta bacteriocina é sintetizada pela *Agrobacterium vitis* (sin. *A. radiobacter*) e possui atividade antagonista contra a bactéria *A. tumefaciens*, agente causador da galha da coroa em plantas.

Em 1982, Cooksey e Moore, demonstraram que a *Agrobacterium vitis* exercia controle sobre a *Agrobacterium tumefaciens*. Foram utilizados mutantes para a produção da agrocina 84 e tais autores verificaram que estes não eram capazes de prevenir o surgimento das galhas no hospedeiro. Atualmente, esta bacteriocina é comercializada na Austrália com o nome Nogall™ (BASF). Entretanto, a aplicação é restrita a sementes, caules e raízes de nozes, amêndoas e rosas, em viveiros (BASF, 2016). A formulação é baseada na cultura desarmada de *Agrobacterium vitis*, produtora da bacteriocina agrocina 84.

Além do uso das bacteriocinas como agentes de biocontrole, outra vertente promissora tem sido demonstrada: sua utilização como bioestimulantes do crescimento/ desenvolvimento de plantas e proteção contra estresses abióticos (SUBRAMANIAN e SMITH, 2015). Nos trabalhos desenvolvidos por Bai et al. (2002; 2003) foi observado que a estirpe NEB17 de *Bacillus thuringiensis* quando co-inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, promoveu o crescimento, nodulação e rendimento de grãos de soja. Mais tarde, o agente responsável por essa promoção do crescimento foi isolado e denominado de turicina 17 (Th17) (GRAY et al., 2006).

Além dessa capacidade, a turicina 17 também tem demonstrado propriedades de alívio ao estresse abiótico, como a aceleração de germinação de sementes sob estresse salino (SUBRAMANIAN, 2013) e aumento da biomassa sob estresse hídrico (PRUDENT et al., 2015). Apesar dos maiores avanços serem voltados a turicina 17, outras bacteriocinas também tem sido demonstradas com essas propriedades, como a bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei* (NARASIMHA MUTHY et al., 2016) e a Bac IH7, produzida por *B. subtilis* estirpe IH7 (HAMMAMI et al., 2011). Assim, a possibilidade de utilização desses peptídeos antimicrobianos atinge uma grande amplitude de benefícios de interesse agrícola, e constituem ótimas alternativas ao uso de insumos químicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as atividades descritas nesse estudo foram realizadas nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

4.1 Microrganismos e condições de crescimento

Para a expressão heteróloga da bacteriocina denominada gluconacina foi utilizada a bactéria *E.coli*, estirpe BL21-AI™ como controle e a mesma portando o vetor de expressão p17_GDI0415_HIS (OLIVEIRA, 2013). O cultivo foi realizado em meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. Os microrganismos e os meios de cultivo utilizados nos ensaios de antagonismo estão listados da Tabela 1. As bactérias foram cultivadas a 30°C sob agitação de 180 rpm durante 24 horas, e os fungos foram cultivados sob a mesma temperatura por 10 dias.

Tabela 1- Microrganismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana

Espécies	Característica Importante	Estirpe	Meio de Cultura*	Fonte
Gram negativas				
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Diazotrófica – Cana-de-açúcar	BR11281 -PAL5	DYGS	A
		BR11288	DYGS	A
		BR11247	DYGS	A
		BR11284	DYGS	A
		BR11280	DYGS	A
		BR11249	DYGS	A
		BR11237	DYGS	A
		BR11290	DYGS	A
		BR11279	DYGS	A
		BR11240	DYGS	A
		BR11313	DYGS	A
		BR11334	DYGS	A
		BR11287	DYGS	A
BR11312	DYGS	A		
<i>Gluconacetobacter johannae</i>		BR12106	DYGS	A
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		HCC103		A
		BR11197	DYGS + 2,0 g/L ácido málico	
		BR11506		
		BR11192		
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		BR11335- HRC54	DYGS + 2,0 g/L ácido málico	A
<i>Nitrospirillum amazonense</i>		BR11145 - CbamC	DYGS + 2,0 g/L ácido málico	A
<i>Paraburkholderia tropica</i>		BR11366 - Ppe8	DYGS + 2,0 g/L ácido málico	A

<i>Xanthomonas albilineans</i>		ICMP196	DYGS	B
<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i>		179	DYGS	B
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Fitopatogênica – Cana-de-açúcar	1983	DYGS	B
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>		660	DYGS	B
<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>		1311	DYGS	B
<i>Ralstonia solanacearum</i>		292	Nutriente ágar	B
<i>Xanthomonas perforans</i>	Fitopatogênica - Tomate	2370	Nutriente ágar	B
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>		836	Nutriente ágar	B
Gram positivas				
<i>Bacillus thuringiensis</i>	BPCV – Cana-de-açúcar	LMC12	LB	A
		LMC21	LB	A
		LMC42	LB	A
Fungos				
<i>Colletotrichum falcatum</i>	Fitopatogênico – Cana-de-açúcar	-	BDA	A
<i>Fusarium moniliforme</i>		-	BDA	A
<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>lycopersici</i>	Fitopatogênico - Tomate	Raça 1	BDA	A
		Raça 2	BDA	A
		Raça 3	BDA	A

***DYGS:** (g/L) 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O, 15,0 ágar – pH 6,0. **LB:** (g/L) 5,0 extrato de levedura; 10,0 NaCl; 10,0 triptona, 20,0 ágar - pH7,0. **Nutriente ágar:** (g/L) 5,0 peptona para carne; 3,0 extrato de carne; 5,0 NaCl; 12,0 ágar – pH 7,0 ***BDA:** meio comercial (KASVI - 42,0 g/L) - pH 6,0 - A: Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner. B: Instituto Biológico.

4.2 Condições de expressão da gluconacina recombinante

As avaliações descritas a seguir tiveram como objetivo analisar interferências no crescimento da estirpe BL21-AI_ p17_GDI0415_HIS, assim como sua interferência na expressão da gluconacina recombinante.

a) Temperatura de cultivo e tempo de indução da estirpe recombinante

Foram realizados pré inóculos da estirpe hospedeira BL21-AI vazia (controle) e portando o vetor de expressão pDEST17_GDI0415_HIS conforme descrito anteriormente. Em seguida, a cultura bacteriana foi reinoculada em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio fresco, com a $D.O_{600nm}$ ajustada para 0,05. As suspensões foram incubadas sob a agitação de 180 rpm, sob as seguintes temperaturas de crescimento: 16; 25; 30 e 37 °C. Ao alcançar a metade da fase log, com $D.O_{600nm}$ de 0,4, as culturas receberam a adição do indutor de expressão L-arabinose (0,2%). Nessa fase, ocorreu a avaliação da indução da expressão da bacteriocina recombinante nos tempos: T0) 0 min; T1) 0.5 hr; T2) 1hr; T3) 2 hrs); T4) 4 hrs; T5) 6 hrs e T6) 24 horas.

Após o período de incubação foram coletados 3,0 mL de cultura bacteriana, que foram centrifugados a 4.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular, ressuspensionado em 300 µL de tampão de lise (tampão fosfato de potássio 50 mM, NaCl 400 mM; 100 mM KCl; glicerol 10%; Triton X-100 0,5%, pH 7,8). Posteriormente foi promovida a lise celular por sonicação, utilizando o equipamento 550 *Sonic Dismembrator*. Foram empregados 5 ciclos de 15 segundos, 15% de amplitude, com intervalos de 1 minuto.

As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições acima para separação das frações solúvel e insolúvel. A separação dos extratos proteicos foi monitorada por eletroforese em gel de acrilamida a 12% (SDS-PAGE).

b) Avaliação de meios de cultivo

Em erlenmeyers de 1 L contendo 200 mL de meio de cultura, foi realizado o cultivo da estirpe BL21-AI_p17_GDI0415_HIS nas melhores condições (temperatura e tempo de indução) observadas na análise acima. Foram testados dois meios de cultivos para a expressão da gluconacina recombinante: LB (g/L) –extrato de levedura 5,0; NaCl 10,0; triptona 10,0 e SB (g/L) –extrato de levedura 20,0; triptona 32,0; Na₂HPO₄ 25 mM; KH₂PO₄ 25 mM; NH₄Cl 50 mM; Na₂SO₄ 5 mM.

A cultura bacteriana foi incubada à 25°C, sob agitação de 180 rpm até atingir a D.O_{600nm} de 0,4. Nessa fase foi realizada a indução da expressão da proteína recombinante através da adição de 0,2% de L-arabinose, conforme o item anterior. A suspensão bacteriana permaneceu nas mesmas condições de cultivo por mais 4 horas. Após o término da incubação, toda cultura bacteriana foi centrifugada a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sedimento celular referente a cada tratamento foi pesado e posteriormente ressuspensionado em tampão de lise (tampão fosfato de potássio 50 mM, NaCl 400 mM; 100 mM KCl; glicerol 10%; Triton X-100 0,5%, pH 7,8). A obtenção da fração solúvel e insolúvel foi feita conforme o item anterior. O perfil de expressão foi monitorado em SDS-PAGE.

c) Avaliação de cultivo realizado em agitador e biorreator

A partir de um pré inóculo de BL21-AI_p17_GDI0415_HIS, ajustou-se 1L de meio de cultura LB para a D.O_{600nm} 0,05. O cultivo foi feito na melhor temperatura e com o tempo de indução mais favorável à expressão da gluconacina recombinante, conforme determinado anteriormente. Nessa etapa foi feita a comparação do crescimento celular realizado em agitador (em erlenmeyer de 2L) e em biorreator, sob as seguintes condições de aeração: vazão do ar: 2vvm, pressão O₂: 100%. O crescimento bacteriano de cada tratamento foi acompanhado por leituras periódicas da densidade óptica a 600nm, em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/Vis Lambda 11).

Após o tempo de incubação, o sedimento celular referente a 200 mL de cultura foi centrifugado a 14.000 rpm, 4°C por 15 minutos. O sedimento celular referente a cada tratamento foi pesado e posteriormente ressuspensionado em tampão de lise seguido de etapa de sonicação. Após a obtenção da fração solúvel, o perfil de expressão das amostras foi monitorado em SDS-PAGE. Antes da lise celular, o volume do tampão de lise de cada amostra foi ajustado para que a densidade celular resultante fosse a mesma em todas as amostras. Assim, a produtividade de proteína por célula pôde ser comparada diretamente com base na espessura da banda proteica.

4.3 Purificação e quantificação da gluconacina recombinante

4.3.1 Seleção da metodologia de purificação

O processo de purificação da gluconacina recombinante foi realizado através da técnica de cromatografia de afinidade por níquel, utilizando a coluna His Gravitrap (GE). A seguir são descritas as avaliações feitas dentro de dois protocolos centrais.

a) Otimização da purificação conforme alterações nas concentrações de imidazol (recomendações do fabricante da coluna His Gravitrap) – Protocolo A

Em cada coluna de purificação, foi utilizada a fração solúvel (8,0 mL) referente ao sedimento celular de 200 mL de cultura (BL21-AI_p17_GDI0415_HIS). A obtenção dessa fração foi realizada conforme as etapas anteriores, porém, a fase inicial de ressuspensão do sedimento celular ocorreu em 8,0 mL de tampão de ligação (fosfato de sódio 20mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM - pH 7,4).

Em colunas previamente equilibradas com tampão de ligação, aplicou-se a fração solúvel, e em seguida foram realizadas lavagens com o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol: 0; 5; 10; 15; 20; 50; 100 e 200 mM. A gluconacina recombinante foi eluída com 5,0 mL de tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM). Foram coletadas e aplicadas em gel SDS-PAGE amostras do eluato de todas as etapas do processo de purificação (1º passagem pela coluna, lavagens e eluição).

b) Protocolo B

O preparo das frações proteicas e o processo de purificação foram realizados de acordo com Eto (2015), com modificações. Após a centrifugação de 200 mL de cultura de BL21-AI_p17_GDI0415_HIS, o sedimento celular resultante foi ressuspensionado em 4 mL do tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM – pH 7,4), acrescido do mesmo volume de sarcosil (L-lauril sarcosil) (concentração final 10%). Posteriormente foi realizada a lise celular por sonicação com 20 ciclos de 15 segundos, 15% de amplitude e intervalos de 1 minuto entre cada ciclo. O extrato proteico bruto foi então centrifugado a 14.000 rpm, a 4 °C por 15 minutos para obtenção das frações solúvel e insolúvel.

Após equilibrar a coluna com tampão de ligação (8,0 mL), aplicou-se a fração solúvel (8,0 mL). A coluna de purificação foi mantida sob agitação suave por 2 hrs para maior adsorção da proteína recombinante à resina cromatográfica. Após a sedimentação da resina, foram realizadas quatro lavagens, sendo a primeira e a segunda com o tampão L1 (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM - pH 7,4) e a terceira e quarta lavagens com o tampão L2 (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 25 mM - pH 7,4). A eluição da gluconacina recombinante ocorreu com a adição de 5,0 mL do seguinte tampão: 20 mM fosfato de sódio, 50 mM NaCl, 500 mM imidazol- pH 7,4. Com objetivo de visualizar a interferência do surfactante sarcosil no processo, foi utilizado como controle o processamento da amostra e purificação a adição do mesmo. Foram coletadas amostras ao longo das etapas de purificação para monitoramento em gel SDS-PAGE.

b.1) Otimização da concentração de imidazol no processo de purificação

Com objetivo de reduzir as proteínas contaminantes na fração final da purificação, foi realizada a avaliação das seguintes concentrações de imidazol no tampão de ligação e no tampão de lavagem L2. Os tratamentos são descritos na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2- Tratamentos correspondentes a alterações de imidazol nos tampões de ligação e de lavagem L2

Tampão de ligação	Tampão de lavagem L2		
	<i>20 mM</i>	<i>25 mM</i>	<i>30 mM</i>
<i>5,0 Mm</i>	-	T1	T2
<i>10 mM</i>	T3	T4	T5

A eluição da gluconacina recombinante foi realizada com o tampão de eluição, conforme descrito no item anterior. A pureza das eluições foi avaliada em gel SDS-PAGE.

4.3.2 Quantificação da bacteriocina gluconacina purificada

A dosagem da bacteriocina purificada foi determinada pela leitura a 280_{nm} em espectrofotômetro, e aplicando a lei de Lambert-Beer, através da fórmula (HANSEN et al, 2011):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Onde:

A= absorvância a 280 nm

ε = coeficiente de extinção molar

l = caminho óptico (1cm)

c = concentração (M)

O coeficiente de extinção molar (31400 $M^{-1}cm^{-1}$) foi dado através da análise da sequência da bacteriocina no programa ExPASy ProtParam tools.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A detecção da proteína recombinante foi realizada segundo o método de Laemmli et al., (1970). Foram preparados dois géis: um de empacotamento, e outro de separação. O gel de empacotamento foi preparado com 6% de poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 500 mM, pH 6,8 e SDS 0,1 %) e o gel de separação foi feito com 12% poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 2,0 M, pH 8,8 e SDS 0,1 %). Os géis polimerizados foram transferidos para cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM e SDS 0,1 %), e submetidos a carga elétrica para separação das proteínas. Para a aplicação no gel as amostras foram misturadas ao tampão de migração (Tris-HCl a 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol 10 %, DTT 100 mM, β mercaptoetanol 5 % (v/v), SDS 2% e azul de bromofenol a 0,001 %) na mesma proporção (25 μ L), e em seguida foram aplicadas nas canaletas. A migração ocorreu sob 75 v por 17 hrs. Posteriormente, os géis foram incubados em solução de coloração (Comassie R-250 0,3%; etanol 50%; ácido acético 10%), sob agitação suave, por 1 hora e, em seguida, os mesmos foram descorados utilizando solução de descoloração (etanol 40%; ácido acético 10%).

4.5 Bioensaios para avaliação da atividade antimicrobiana de *G. diazotrophicus*

4.5.1 Indução da produção de substâncias antimicrobianas de *G. diazotrophicus* por H₂O₂

a) Avaliação contra bactérias

Para avaliação da produção de substâncias antagonicas, foi utilizada a metodologia de antibiose por difusão em dupla camada, conforme descrito por Kékessy e Piguet (1970), com modificações. Foram utilizadas duas estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a estirpe selvagem PAL5 e a estirpe MUT_GDI0415 (mutante defectivo para a produção da bacteriocina tipo linocina M18) gerada ao longo das atividades de pesquisa de tese de Drechsel (2011). A atividade antagonista foi testada contra as estirpes de *G. diazotrophicus* e as bactérias fitopatogênicas de cana-de-açúcar listadas na Tabela 1.

A partir de um pré-inóculo de PAL5 e MUT_GDI0415, as culturas foram reinoculadas em erlenmeyers contendo 20 mL de meio fresco, ajustando-se a D.O_{600nm} para 0,01. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições de crescimento até atingir a D.O_{600nm} 0,6. Nessa etapa foram adicionados 100 μ M de H₂O₂ às suspensões bacterianas, para a indução de expressão de proteínas antimicrobianas. O cultivo foi mantido por 1 hora, conforme determinado por Drechsel (2011). Após esse período, três alíquotas de 100 μ L das culturas foram inoculadas em pontos equidistantes de placas contendo 25 mL de meio DYGS sólido. Após a secagem das gotas, as placas foram incubadas à 30°C por 24 horas.

Paralelamente, foi feito o cultivo das estirpes a serem avaliadas. Após atingirem a D.O_{600nm} 0,6-1,0, as suspensões foram utilizadas na camada que sobrepôs as alíquotas de *G. diazotrophicus* (PAL5) e MUT_GDI0415 já incubadas anteriormente. Para o preparo da sobrecamada, 1,0 mL de cada estirpe foi adicionado a 4,0 mL de meio DYGS semissólido (4,5 g/L de ágar) fundido e vertido sobre as placas. O cultivo foi incubado a 30° C por 24 horas e avaliado visualmente para a presença dos halos de inibição. Os ensaios foram realizados em triplicata.

b) Avaliação contra fungos

A produção de substâncias antimicrobianas da estirpe PAL5 após a adição de H₂O₂ também foi realizada sobre os fungos fitopatogênicos listados na Tabela 1. A indução da expressão de proteínas antagonistas ocorreu conforme descrito no item anterior. Após o tempo de incubação, riscou-se a suspensão bacteriana com swab na placa de Petri contendo o disco micelial (10 mm) do fungo avaliado. O espalhamento foi realizado no perímetro de 2,0 cm de distância do disco micelial. Foram utilizados como controle a suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus* sem adição de H₂O₂ e meio DYGS + H₂O₂ (100µM). A avaliação foi realizada após 7 dias através do percentual de inibição (PI), obtido através da seguinte fórmula (DENNIS; WEBSTER, 1971):

$$PI = \left(\frac{(C - T)}{C} \right) \times 100$$

Onde: C - Diâmetro (mm) da colônia na ausência da bactéria antagonista; e T - diâmetro (mm) da colônia na presença da bactéria antagonista.

4.6 Avaliação do espectro de atuação da bacteriocina gluconacina

Para checar o espectro da atividade antimicrobiana da bacteriocina foi utilizada a metodologia de bioensaio em suspensão para as estirpes bacterianas (FERNANDEZ et al, 2017), e a metodologia de difusão em disco para os fungos (HEATLEY, 1944). As avaliações foram realizadas contra uma estirpe de *G. diazotrophicus* representante de cada tipo eletroforético (ET), conforme descrito por CABALLERO-MELLADO et al. (1995) - BR11288 - ET1, BR11247 - ET3, BR11284 - ET4, BR11280 - ET5, BR11249 - ET6, BR11237 - ET7, além dos outros microrganismos citados na Tabela 1.

Alíquotas (300 µL) de células crescidas como já descrito anteriormente foram transferidas para tubos a uma concentração de 10⁵ a 10¹¹ UFC/mL seguido da adição do mesmo volume de gluconacina purificada (concentração final 0,5µg/µL) ou tampão de eluição (controle negativo). Os tubos foram incubados a 30°C sob agitação de 180 rpm, por 24 horas. O efeito da bacteriocina foi analisado visualmente através da turbidez da suspensão bacteriana tratada ou não pela adição da gluconacina. A avaliação também ocorreu através da contagem de células viáveis (UFC/mL) em meio de cultura apropriado para cada espécie.

Para a avaliação da atividade antifúngica, 2,0 mL de solução salina (0,9% NaCl) foram adicionados à placa contendo cada cultura, e com auxílio da alça de platina as hifas foram suavemente raspadas. Em seguida, 400 µL dessa suspensão foram espalhados em placas contendo meio BDA sólido. Após a secagem, discos de celulose embebidos em 20 µL da bacteriocina purificada (1,0 µg/µL) ou tampão de eluição (controle) foram colocados em pontos equidistantes da placa. Os sistemas foram incubados a 30°C, 24 horas e então analisados visualmente para a presença de halos de inibição, bem como quantitativamente através da medição destes.

4.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) da gluconacina contra fitopatógenos

Os fitopatógenos que foram antagonizados pela bacteriocina gluconacina foram submetidos a uma nova avaliação para determinação da CMI necessária para que ocorresse o antagonismo. Os ensaios foram realizados conforme descrito por Oliveira et al. (2009), com modificações. As estirpes foram cultivadas conforme previamente descrito, até uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,5-0,8. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 15 min) e ressuspensas em 100 μ L de meio fresco, obtendo-se uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL. Posteriormente foram realizadas diluições da gluconacina purificada em tampão de eluição, e 100 μ L de cada diluição foram adicionados à suspensão bacteriana, obtendo-se as seguintes concentrações finais: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 μ g/ μ L. O tampão de eluição foi utilizado como controle. A cultura foi mantida à 30°C, 180 rpm por 24 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado através da contagem de células viáveis (UFC/mL) em meio apropriado para cada espécie. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.7 Caracterização do efeito antimicrobiano da gluconacina

As análises a seguir foram realizadas com a bactéria fitopatogênica *X. albilineans*, utilizada como microrganismo modelo.

4.7.1 Avaliação do efeito da gluconacina sobre a viabilidade de *X. albilineans* - Curva de letalidade

O ensaio de curva de letalidade teve como objetivo verificar o tempo necessário para que a gluconacina desempenhasse sua ação bactericida sobre o fitopatógeno *X. albilineans*. A metodologia utilizada foi descrita por Okuda et al (2013). Em placas de 96 poços foram adicionados 100 μ L de suspensão bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC/mL) e 50 μ L de gluconacina purificada com a concentração final equivalente à CMI anteriormente determinada. As placas foram incubadas a 30°C, 180 rpm. Foi realizada a contagem de células viáveis (UFC/mL) em diferentes tempos de incubação: 0; 15, 30, 45 e 60 minutos. O tampão de eluição foi utilizado como controle negativo.

4.7.2 Determinação do mecanismo de ação

a) Avaliação da alteração da morfologia celular

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observar as alterações morfológicas na célula da estirpe modelo quando tratada com a gluconacina. As suspensões bacterianas tratadas ou não foram incubadas a 30°C, 180 rpm, 15 min. Após a incubação, as células foram analisadas através do microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss EVO LS 10. A metodologia de preparo das grades, assim como a contrastação das células foi realizado segundo Videira, Cruz e Baldani (2003).

b) Avaliação de permeabilidade e integridade da membrana celular

O cultivo de *X. albilineans* foi feito conforme mencionado anteriormente. Um mililitro da suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL) foi coletado e centrifugado a 4000 rpm por 15min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado em 1,0 mL de água desmineralizada. Gluconacina foi adicionada à suspensão celular obtendo-se a concentração de 1 x CMI. A incubação foi feita à 30°C, 180 rpm, em diferentes tempos (0; 7,5; 15 e 30 min). A suspensão bacteriana foi centrifugada e o sobrenadante utilizado na determinação de fosfato inorgânico extracelular e na medição de compostos absorventes de UV. O sedimento celular coletado foi ressuspensionado em água desmineralizada (1,0 mL) e incubado a 95°C por 10min, para o rompimento celular. As células foram removidas por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e o sobrenadante foi utilizado para determinação de fosfato inorgânico intracelular. Foi empregado o método colorimétrico Mo-Sb para determinação de fosfato inorgânico (AMES, 1966) e a medição de compostos absorventes de UV foi realizada através da absorbância obtida a 260 e 280 nm em espectrofotômetro UV-visível.

b.1) Análises de microscopia confocal de varredura a laser

Para visualizar os danos causados às membranas celulares das bactérias após o tratamento com gluconacina, foram realizadas análises em microscópio confocal usando o kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Termo Fisher Scientific). Em função de problemas com a eficiência do kit em distinguir células danificadas e intactas na bactéria *X. albilineans*, as análises foram realizadas sobre *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, para a qual o kit mostrou-se eficiente. Incubou-se 500 µL da suspensão bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC/mL) na presença do mesmo volume de bacteriocina (concentração final 1 x CMI) ou tampão de eluição por 1, 12 e 24 horas. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada e ressuspensionada em 200 µL de solução salina (0,85% NaCl). Foram adicionados 3,0 µL da mistura de corantes (1,5 µL SYTO9, 1,5 µL iodeto de propídio) à suspensão de células incubando-se por 15 minutos, no escuro. Cinco microlitros da suspensão foram adicionados a uma lâmina de microscopia e esta foi examinada no microscópio confocal a laser LSM 700 (Zeiss).

4.7.3 Caracterização físico-química da gluconacina

A caracterização físico-química da bacteriocina gluconacina consistiu em avaliar sua estabilidade quanto à atividade antimicrobiana frente a alterações de temperatura e pH, assim como à exposição a surfactantes e enzimas proteolíticas. A verificação da atividade antimicrobiana residual após os tratamentos foi realizada através da metodologia de difusão em disco. Os ensaios de antagonismo foram feitos contra a bactéria *X. albilineans*, como microrganismo indicador. O cálculo da atividade antimicrobiana residual (AR) em termos percentuais foi feito através da fórmula:

$$AR (\%) = \left(\frac{HT - 6}{HC - 6} \right) \times 100$$

Onde: HT – Halo (mm) produzido pela bacteriocina submetida ao tratamento; e HC - Halo (mm) produzido pela bacteriocina não submetida ao tratamento (Controle). * 6: diâmetro do disco.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e tiveram dois controles: tampão de eluição (controle -) e bacteriocina não submetida aos tratamentos (controle +)

a) Efeitos de temperatura

A determinação de estabilidade da atividade antimicrobiana da bacteriocina foi feita frente às faixas de temperatura: 25° (temperatura ambiente), 45°, 60°, 80° e 100°C, nos seguintes tempos de incubação: 15, 30, 45 e 60 minutos. Também foi avaliada a estabilidade proteica frente à condição autoclavagem, na qual amostras da bacteriocina foram incubadas a 121°C/115 kPa por 15 minutos.

b) Efeitos de pH

Alíquotas da bacteriocina tiveram o pH reajustado para as seguintes faixas: 2; 4; 10 e 12. Os ajustes foram realizados com soluções estéreis de NaOH e HCl a 1,0 Mol/L. As alíquotas mais um controle pH 7,4 foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, o pH das amostras foi corrigido para 7,4 utilizando soluções de NaOH e HCl (1,0 Mol/L) estéreis, e em seguida foi realizado o teste de antagonismo, como descrito anteriormente.

c) Efeitos de surfactantes

O efeito de surfactantes sobre a atividade antimicrobiana da bacteriocina foi verificado pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS), Uréia, Tween 20, Tween 80, Triton x-100 e EDTA (concentrações finais de 1% w/v). Todas as alíquotas foram incubadas por 2 horas a 30°C, e em seguida foi realizado o teste de antagonismo com as mesmas, conforme o especificado.

d) Efeitos de enzimas proteolíticas e glicolíticas

Alíquotas da bacteriocina gluconacina e do tampão de eluição (controle) foram incubadas a 37°C por 2 horas na presença de 1,0 mg/ml de proteinase K (Sigma Aldrich), lisozima (Sigma Aldrich), tripsina (Sigma Aldrich), pepsina (Sigma Aldrich) e termomyl 2x

(α -amilase) (Novozymes). Após o tempo de incubação, as alíquotas foram tratadas por 5 minutos a 100°C, para inativação das enzimas, e em seguida foi monitorada a atividade antimicrobiana, conforme acima.

4.8 Ensaios de biocontrole sob condições de casa de vegetação

4.8.1 Desinfestação e germinação das sementes

A validação *in vivo* da atividade antibacteriana da gluconacina foi realizada em plantas de tomate, cultivar Gaúcho. Para desinfestação superficial das sementes, estas foram tratadas, sob agitação, com as seguintes soluções: etanol 50%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio 0,5%, 3 minutos e quatro lavagens com água destilada estéril. Após a secagem, as sementes foram colocadas em bandejas de germinação contendo areia lavada, substrato Mecplant horta 1 e solo (1:1:1), e foram mantidas sob condições de casa de vegetação (28 – 32°C).

4.8.2 Ensaios de proteção de mudas contra murcha-bacteriana e avaliação da severidade da doença

Quinze dias após a germinação (DAG), as plantas de tomate, variedade Gaúcho, foram transferidas para copos (500 mL) contendo a mesma mistura de solo usada nas bandejas. No momento do transplante foi feita a lavagem e corte (1 cm) das raízes, seguido de imersão por 3 minutos em solução contendo gluconacina (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), tampão de eluição ou solução salina (controles). Uma hora após o procedimento foi feito o desafio com o fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*. O inóculo foi preparado conforme o descrito no item 4.1. As células foram sedimentadas por centrifugação e ressuspensas em solução salina (10^8 UFC/mL). A inoculação nas plantas seguiu o mesmo procedimento de imersão de raízes. Foram utilizadas dez plântulas por tratamento. O experimento foi mantido até 25 dias após a inoculação (DAI) do patógeno.

4.8.3 Ensaios de proteção de mudas contra mancha bacteriana e avaliação da severidade da doença

Plantas de tomate com 15 DAG foram transferidas para copos plásticos de 500 mL contendo a mesma mistura de solo descrita acima, e foram pulverizadas com solução de gluconacina (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou controles: tampão de eluição (controle 1) e solução salina (controle 2). Uma hora após o procedimento, as plântulas foram pulverizadas com a suspensão contendo 10^8 UFC/mL do fitopatógeno *X. perforans* (estirpe 2370). Vinte e quatro horas antes e após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de umidificação, com 70% de umidade. Plantas não inoculadas com o patógeno foram utilizadas como controle negativo.

As avaliações foram realizadas aos 7, 10, 13 e 16 DAI, e aconteceram de três formas descritas a seguir:

- I) Número de lesões do segundo par de folhas (NL)
- II) Porcentagem de folhas sintomáticas (FLS)
- III) Porcentagem de folíolos sintomáticos (FOL)

Após o término das avaliações, os dados foram integrados ao longo do tempo e a severidade da mancha-bacteriana foi determinada através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pela fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i) \text{ (SHANER e FINNEY, 1977)}$$

Em que x é expresso por NL, FLS ou FOL de acordo com as formas de avaliação descritas acima; t: o tempo e n: o número de avaliações no tempo. Para cada tratamento foram utilizadas 10 plantas. As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância no programa SISVAR, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da expressão da gluconacina recombinante

Inicialmente, foram realizadas avaliações do nível de expressão da gluconacina recombinante sob diferentes temperaturas de cultivo e tempos de indução da estirpe hospedeira BL21_AI e portando o vetor de expressão p17_GDI0415_HIS. Conforme indicado nas Figuras 1 e 2, foi possível observar a banda de 31,7 kDa referente à bacteriocina recombinante (29,09 kDa da bacteriocina +2,6 kDa da cauda de histidina) em todas temperaturas de crescimento avaliadas. Entretanto, o início e os níveis da expressão diferiram entre os tratamentos. Conforme o esperado, o cultivo da estirpe BL21_AI vazia (controle) não expressou a proteína em nenhum dos tratamentos (Figura 3).

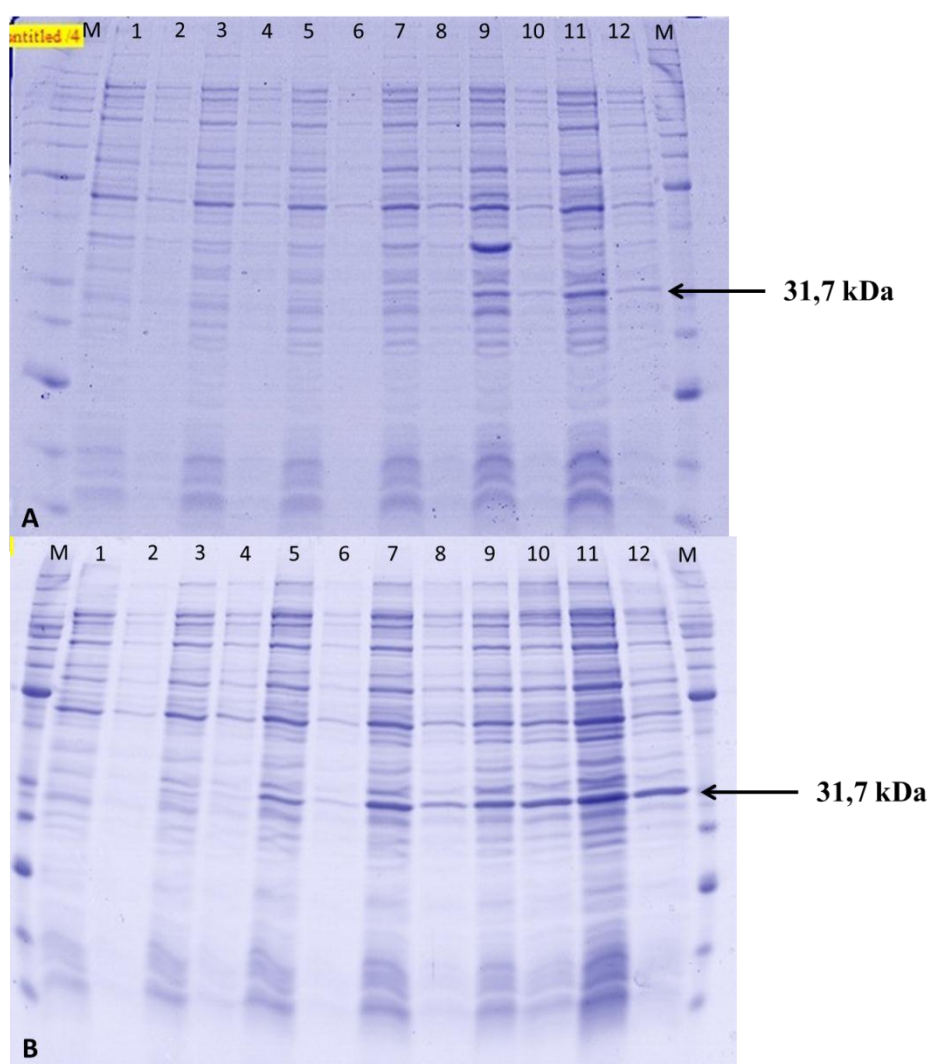


Figura 1 - Efeito da temperatura de cultivo da estirpe hospedeira portadora do vetor de expressão e tempos de indução sobre o nível de expressão da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa). A) 16°C; B) 25°C. Colunas 1 e 2: Frações solúvel e insolúvel em T0 (0 min), Colunas 3 e 4: Frações solúvel e insolúvel em T1 (0,5 hora), Colunas 5 e 6: Frações solúvel e insolúvel em T2 (1 hora). Colunas 7 e 8: Frações solúvel e insolúvel em T3 (2 horas), Colunas 9 e 10: Frações solúvel e insolúvel em T4 (4 horas), Colunas 11 e 12: Frações solúvel e insolúvel em T5 (6 horas). M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)

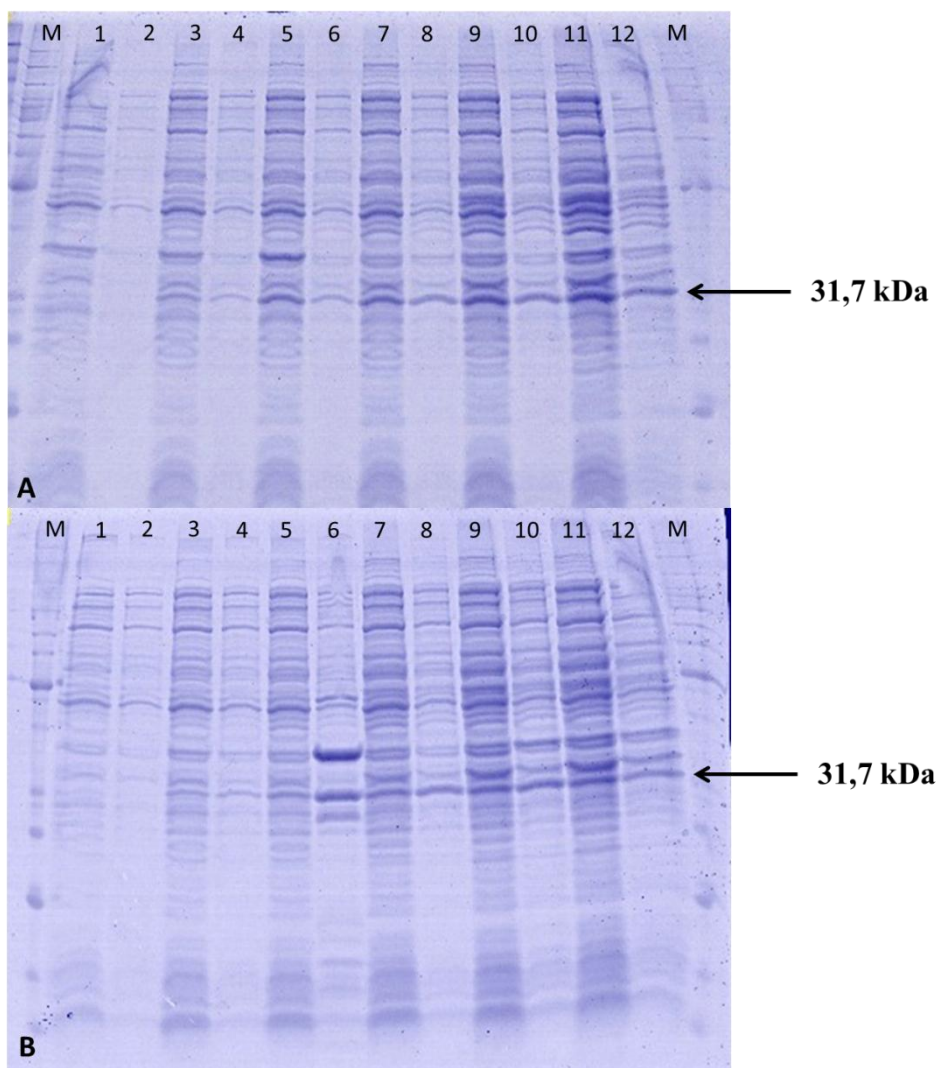


Figura 2 - Efeito da temperatura de cultivo da estirpe hospedeira portadora do vetor de expressão e tempos de indução sobre o nível de expressão da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa). A) 30°C; B) 37°C. Colunas 1 e 2: Frações solúvel e insolúvel em T0 (0 min), Colunas 3 e 4: Frações solúvel e insolúvel em T1 (0,5 hora), Colunas 5 e 6: Frações solúvel e insolúvel em T2 (1 hora). Colunas 7 e 8: Frações solúvel e insolúvel em T3 (2 horas), Colunas 9 e 10: Frações solúvel e insolúvel em T4 (4 horas), Colunas 11 e 12: Frações solúvel e insolúvel em T5 (6 horas). M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)

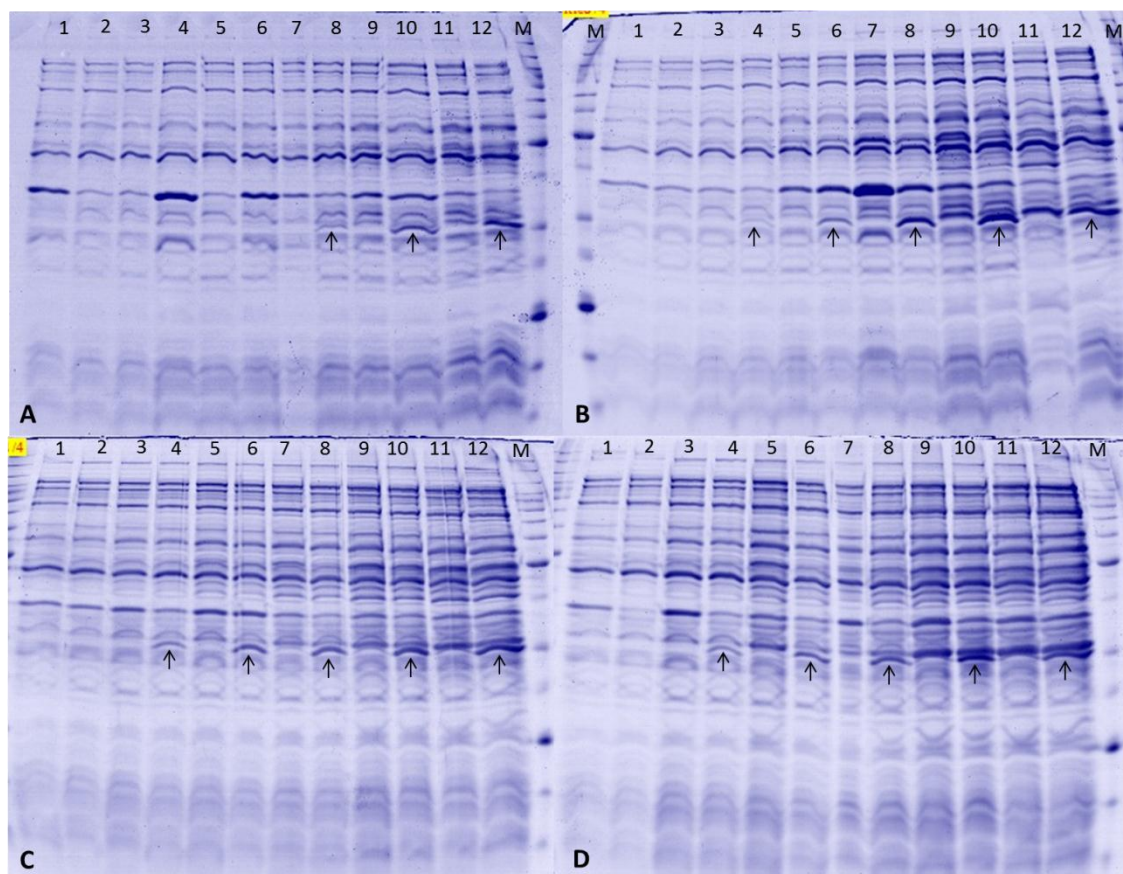


Figura 3 - Efeito da temperatura de cultivo da estirpe hospedeira BL21 (controle) e portando o vetor de expressão, e tempos de indução sobre o nível de expressão da gluconacina recombinante (setas: banda correspondente - 31,7 kDa). A) 16°C, B) 25°C, C) 30°C e 37°C e tempos de indução da expressão da proteína (setas). BL21-AI com indução nos tempos: T0 (0 min) (Coluna 1), T1(0,5 hr) (Coluna 3), T2 (1 hr) (Coluna 5), T3 (2hrs) (Coluna 7), T4 (4 hrs) (Coluna 9), T5 (6 hrs) (Coluna 11). BL21_ p17_GDI0415_HIS com indução nos tempos: T0 (0 min) (Coluna 2), T1(0.5 hr) (Coluna 4), T2 (1 hr) (Coluna 6), T3 (2hrs) (Coluna 8), T4 (4 hrs) (Coluna 10), T5 (6 hrs) (Coluna 12)

Na temperatura mais baixa (16° C), o início da expressão ocorreu 2 horas após a adição do indutor, L-arabinose (Figura 1A). Sob essa temperatura de cultivo também foi possível observar, embora com pouca intensidade, a presença da bacteriocina na porção insolúvel do extrato proteico. Conforme o aumento da temperatura de cultivo foi possível observar que a expressão começou de forma mais precoce, sendo iniciada aos 30 minutos após a adição do indutor nas demais temperaturas avaliadas (Figura 1B e Figura 2).

Os níveis de expressão, conforme observado nas frações solúvel e insolúvel, aumentaram conforme o tempo de indução em todos os tratamentos, não sendo observada diferença significativa na porção solúvel após 4 horas nas temperaturas 25, 30 e 37°C (Figura 1B e Figuras 2 e 4). Os resultados sugerem que esse tempo foi suficiente para alcançar os níveis máximos de expressão da bacteriocina recombinante a partir de 25°C. Apesar da bacteriocina gluconacina ainda ser expressa na porção insolúvel, a temperatura de 25°C mostrou-se como mais apropriada para o cultivo, visto que nas temperaturas superiores sua disponibilidade na fração solúvel foi diminuída, indicando maior expressão na forma de agregações insolúveis.

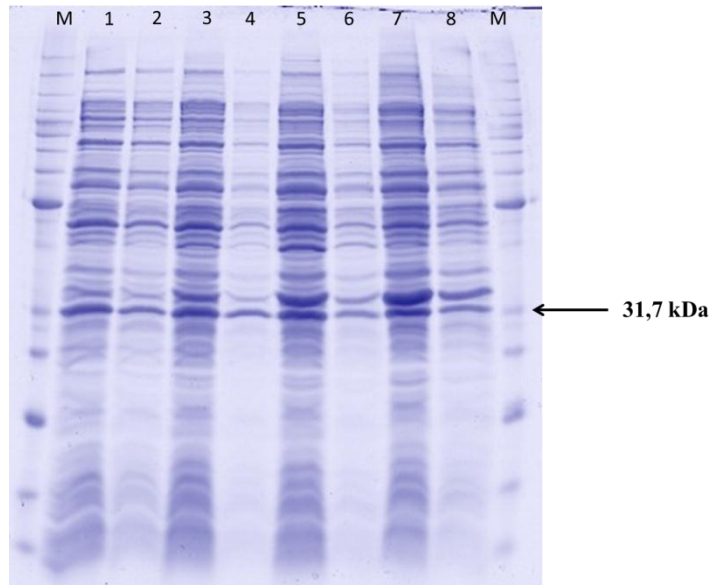


Figura 4 - Expressão da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa) sob diferentes temperaturas de cultivo da estirpe hospedeira portando o vetor de expressão e 24 horas (T6) de indução da expressão. Colunas 1 e 2: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas a 16°C. Colunas 3 e 4: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas à 25°C. Colunas 5 e 6: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas à 30°C. Colunas 7 e 8: Frações solúvel e insolúvel das células cultivadas à 37°C. M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)

Testes de expressão em pequena escala são amplamente utilizados como ferramenta preditiva para determinar as condições necessárias para produzir proteína na porção solúvel e assim estabelecer as condições ideais para o cultivo em larga escala (PAL e SRIVASTAVA, 2015). As condições de cultivo podem influenciar a produção de bacteriocinas de duas formas: A) nos níveis de expressão proteica por célula, e B) na densidade de célula por volume de cultura.

Encontrar uma condição em que esses dois fatores sejam elevados não é facilmente atingido, assim a otimização de alguns parâmetros pode auxiliar na obtenção de níveis satisfatórios da bacteriocina recombinante (BASHIRI et al., 2015). Vários fatores são determinantes no crescimento celular e na expressão proteica, dentre eles: meio de cultivo adequado, o que inclui pH e fonte de carbono, temperatura, aeração, concentração do indutor e tempo de indução (GUPTA e SHUKLA, 2015; BASHIRI, 2015). Dentre esses fatores, a temperatura de crescimento das células hospedeiras tem sido demonstrada como um dos principais parâmetros a serem investigados (SINGHA et al., 2017), isso em função, principalmente, da sua correlação com a solubilidade proteica. Diversos estudos têm relatado que a solubilidade das proteínas é favorecida por cultivo e indução a baixas temperaturas e por períodos prolongados (GOPAL e KUMAR, 2013).

No presente trabalho, os melhores níveis de expressão da gluconacina a 25°C e 4 horas de indução, corroboram com os dados da literatura. Embora a temperatura ótima para o crescimento de *E.coli* seja 37°C, temperaturas mais amenas são recomendadas visando diminuir a agregação das proteínas recombinantes, ou seja, minimiza a formação de corpúsculos de inclusão (CHEN et al., 2012; SIVASHANMUGAM et al., 2009). Esse efeito pode ocorrer em função da diminuição da taxa de produção da proteína, permitindo que a cadeia seja enovelada de forma correta (PAL e SRIVASTAVA, 2015). Além disso, dois

outros pontos devem ser destacados: I) expressões associadas a fenótipos tóxicos observadas em condições de incubação a 37°C são suprimidas em baixas temperaturas (SAHDEV, KHATTAR, SAINI, 2008); II) a maioria das proteases são menos ativas em temperaturas mais baixas e, assim, a redução da temperatura de expressão também resulta na diminuição da degradação de proteínas proteolicamente sensíveis (PINSACH et al., 2008).

Um bom exemplo para a influência da temperatura na expressão de bacteriocinas recombinantes é verificado nos estudos de Chen et al (2012), em que a produção da sacacina P foi expressa na forma de corpúsculos de inclusão a 37°C, enquanto no cultivo realizado a 20°C a bacteriocina foi apresentada na forma solúvel. Além disso, a influência do parâmetro também pôde ser verificada nos ensaios de atividade biológica. A bacteriocina oriunda da cultura a 20°C apresentou maior antagonismo quando comparada às bacteriocinas produzidas em temperatura mais elevada. Os autores assumiram que mais fragmentos solúveis foram disponibilizados na cultura a baixas temperaturas.

b) Avaliação de meios de cultivo

Após serem estabelecidas as pré-condições de cultivo (temperatura e tempo de indução) em pequena escala (50 mL), aumentou-se a produção da gluconacina para 1L de cultura. Nessa fase o objetivo foi avaliar a influência dos meios de cultivo Luria Bertani (LB) e Super Broth (SB) no crescimento celular e na expressão proteica. Conforme apresentado na Figura 5, a utilização de um meio mais rico (SB) não incrementou o nível de expressão da gluconacina quando comparado ao cultivo realizado em meio LB. Entretanto, a obtenção do volume de células no meio SB (4,0 g) foi o dobro do observado em meio LB (2,1 g).

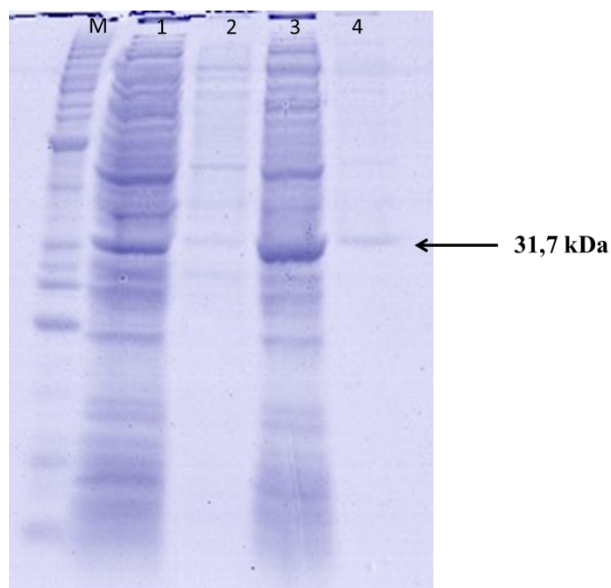


Figura 5 - Expressão da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa) obtida do cultivo das células hospedeiras em meio SB (Fração solúvel – Coluna1, Fração Insolúvel – Coluna 2) e LB (Fração solúvel – Coluna 3, Fração Insolúvel – Coluna 4). M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)

Conforme mencionado anteriormente, a alteração de parâmetros de cultivo pode beneficiar a expressão de bacteriocinas recombinantes através do aumento do número de células ou pelo aumento da expressão proteica por célula (BASHIRI, 2015). Aqui, verificamos que apesar de dobrar o volume de células, realizar o cultivo em meio SB resultou em menor expressão da bacteriocina. Ao avaliar as melhores condições de expressão da Plantaricina E, Pal e Srivastava (2015) também observaram o mesmo efeito - apesar da utilização de um meio de cultivo mais rico gerar maior quantidade de células, o aumento no nível da expressão não foi correspondente.

A composição do meio de cultivo também influencia diretamente na produtividade e qualidade da proteína. O meio Luria Bertani (LB) é o mais utilizado para expressão de bacteriocinas recombinantes em *E.coli* (GHEQUIRE et al., 2017; KAYALVIZHI, RAMESHKUMAR e GUNASEKARAN, 2016, CHEN et al., 2012). Seus componentes fornecem às células: peptídeos e aminoácidos essenciais (fornecido pela triptona), vitaminas e oligoelementos (fornecido pelo extrato de levedura), e íons de sódio, que mantém o equilíbrio osmótico (fornecido pelo cloreto de sódio) (SAHDEV et al., 2008). Embora seja um meio rico, o meio de cultivo LB não dá suporte a densidades celulares muito elevadas, principalmente por conter baixas quantidades de fonte de carbono e cátions divalentes. Já os meios de cultivo 2xYT (NAKANO et al, 2000), Terrific Broth (TB) (PAL e SRIVASTAVA, 2012) e Super Broth (SB) (KRAM e FINKEL, 2015) proveem melhores condições para altas densidades celulares.

Considerando as melhores condições de cultivo citadas na literatura, torna-se claro que a otimização dos parâmetros de crescimento é dependente da bacteriocina-alvo, não parecendo haver uma regra geral que se aplique a todos os casos.

c) Avaliação de cultivo realizado em frascos, sob agitação e em biorreator

O crescimento da estirpe BL21_AI_p17GDI0415 obtido em sistema de cultivo convencional, realizado em agitador, diferiu do cultivo realizado em biorreator. A velocidade de crescimento nesse último praticamente dobrou com relação ao observado no primeiro (Figura 6). Além disso, também foi observado um pequeno acréscimo no volume de células obtidas de 1 litro de cultura: 2,0 g (agitador) e 2,8 g (biorreator).

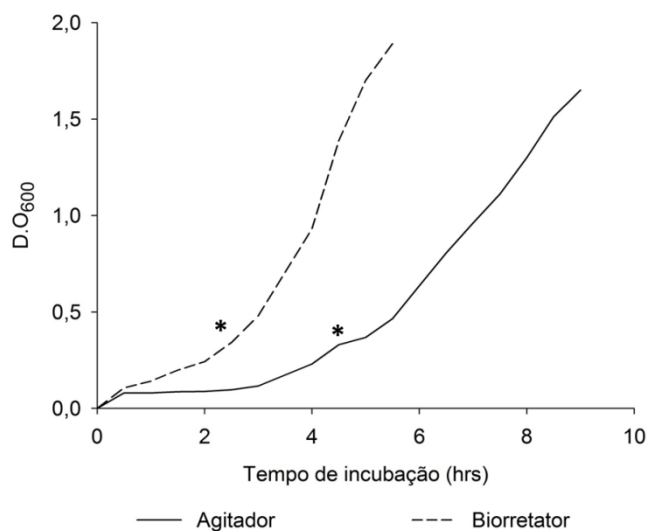


Figura 6 - Perfis de crescimento da estirpe BL21-AI_p17GDI0415 em agitador e biorreator. *Adição do indutor L-arabinose 0,2%

A diferença entre as formas de cultivo também refletiu na expressão proteica. Conforme observado na Figura 7, o crescimento realizado em biorreator resultou em aumento na expressão da gluconacina recombinante.

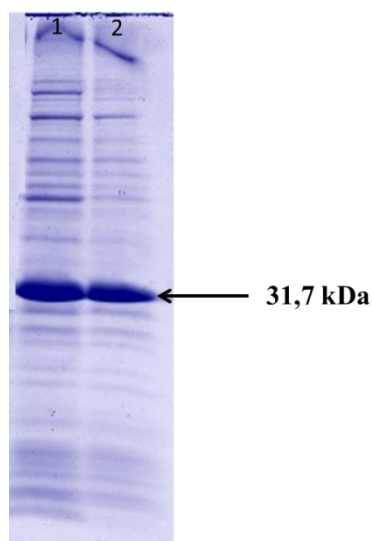


Figura 7 - Expressão da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa) sob cultivo realizado em biorreator (180 rpm, 25°C, vazão do ar: 2vvm, pressão O₂: 100%) (Coluna 1) e agitador (180 rpm, 25°C)

O cultivo de células visando a produção de proteínas recombinantes deve resultar em altas densidades celulares, alta produtividade por célula e boa qualidade proteica. Dentre as principais limitações do cultivo convencional para atingir esses objetivos, o esgotamento de oxigênio tem merecido destaque (KRAUSE et al, 2010). Em frascos de agitação não podem ser alcançadas densidades celulares altas, visto que o rápido crescimento das bactérias excede a capacidade de transferência de oxigênio do recipiente. Sob condições limitadas de oxigênio, o crescimento ocorre de forma mais lenta e a produção de proteínas torna-se inferior (VASALA et al., 2006).

A limitação de oxigênio leva à indução de mais de 200 genes ligados a respostas anaeróbicas (OVERTON et al., 2006; SALMON et al. 2003), que dão continuidade ao estresse causado pela síntese de proteínas recombinantes. Somado a isso, as condições anaeróbicas facilmente conduzem a deterioração do meio de cultura por metabólitos resultantes de anaerobiose.

Com base nos resultados obtidos, o incremento observado na expressão proteica nas células cultivadas em fermentador destaca a importância de condições adequadas de aeração, além de abrir perspectivas para altos níveis de expressão, que podem ser atingidos em condições ótimas de cultivo em grande escala. Altas densidades celulares e elevados níveis de expressão proteica podem ser alcançados nessa forma de cultivo por meio de cultura em batelada alimentada (BASHIRI et al, 2015). Biorreatores com essa forma de cultivo além das vantagens de possibilitar o monitoramento de variáveis como: pH, vazão de ar, oxigênio dissolvido e temperatura, permitem o fornecimento do substrato, de forma a manter sua concentração constante. Essas características tornam o cultivo em batelada alimentada um processo comumente aplicado à produção de proteínas recombinantes em escala industrial, em que a produtividade volumétrica é o objetivo central (UKKONEN, 2014).

5.2 Purificação e quantificação da gluconacina recombinante

5.2.1 Seleção da metodologia de purificação da gluconacina

a) Otimização da purificação conforme alterações nas concentrações de imidazol (recomendações do fabricante da coluna His Gravitrap) – Protocolo A

Conforme o demonstrado na Figura 8, nenhuma das concentrações de imidazol foi efetiva para a purificação da bacteriocina recombinante. Logo na primeira etapa foi observada uma perda significativa de gluconacina (Coluna 1), justificando portanto, a ausência ou baixa intensidade da banda correspondente (31,7 kDa) nas etapas posteriores. A presença da banda 31,7 kDa no perfil eletroforético das amostras provenientes das lavagens realizadas com tampão contendo 100 e 200 mM de imidazol (Colunas 6 e 7, respectivamente) indica uma dessorção residual, não sendo verificada a presença da mesma na fração eluída (Coluna 8).

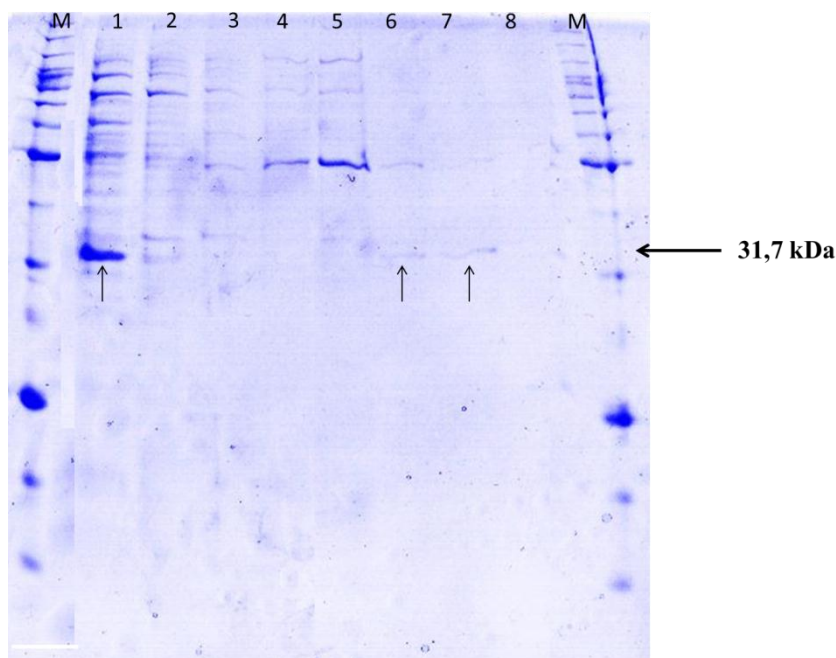


Figura 8 - Efeito da concentração de imidazol no tampão de lavagem sobre a eficiência do processo de purificação da gluconacina recombinante (setas: banda correspondente - 31,7 kDa). Coluna 1: 1º passagem pela coluna de purificação; Coluna 2: lavagem - 5mM imidazol; Coluna 3: lavagem - 10 mM imidazol; Coluna 4: lavagem - 20 mM imidazol, Coluna 5: lavagem - 50 mM imidazol, Coluna 6: lavagem - 100 mM imidazol; Coluna 7: lavagem - 200 mM imidazol; Coluna 8: eluato; M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)

A técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC – *Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*) tem como base a afinidade diferencial dos íons, presentes na matriz sólida, por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução (BRESOLIN et al. 2009). A afinidade é resultante de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e alguns resíduos de aminoácidos tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano (WONG, ALBRIGHT e WANG, 1991).

Dentre as estratégias de purificação de proteínas, pode-se destacar a utilização de resíduos ou etiquetas (“*tags*”), que podem ser adicionados nas porções C ou N-terminal da proteína de interesse. A *tag* de histidina é uma das mais simples e amplamente utilizadas na purificação de bacteriocinas recombinantes (YI, LUO e LU, 2018; JIANG et al, 2016; MILOJEVIC et al, 2015). Esta etiqueta confere à proteína a possibilidade de interação com os íons metálicos imobilizados, facilitando o processo de isolamento da proteína alvo; tendo sido relatados muitos processos de purificação em uma única etapa (FARHANGNIA et al, 2014; RICHARD et al., 2004)

A forte interação da *tag*-his favorece a adsorção da proteína de interesse, enquanto proteínas contaminantes fracamente ligadas à resina são eluídas ao longo das etapas de purificação. A dessorção das biomoléculas ligadas à matriz cromatográfica pode ser feita em diferentes condições. Dentre elas, a mais comumente empregada é a utilização de um agente competidor (ex.: imidazol, histidina, histamina), o qual deve possuir maior afinidade pelo sítio de ligação quando comparado à molécula adsorvida (UEDA, GOUT e MORGANTI, 2003; CHAGA, 2001).

Segundo recomendações contidas em protocolos de purificação, a adição de baixas concentrações do agente competidor, como o imidazol, nos tampões da amostra proteica e nos tampões de lavagem favorecem a ligação da proteína de interesse e diminuem a interação com proteínas contaminantes (HAGEL, JAGSCHIES e SOFER et al, 2008). Aqui, observamos a perda, quase completa, da gluconacina recombinante na primeira passagem pela coluna de purificação, sugerindo-se baixa interação entre os seis resíduos de histidina (His₆) e a coluna cromatográfica.

b) Protocolo B

Com objetivo de aprimorar a purificação da gluconacina recombinante foi empregado o protocolo conforme o descrito por Eto (2015), com modificações. Com relação ao protocolo anterior, a presente avaliação consistiu no acréscimo do surfactante sarcosil (10%) às etapas de processamento de amostras (obtenção das frações solúvel e insolúvel) e purificação da bacteriocina recombinante.

Conforme demonstrado na Figura 9, a adição do surfactante foi essencial para a adsorção da gluconacina-His à resina cromatográfica. Embora tenham ocorrido perdas ao longo das etapas de purificação (Figura 9B, Colunas 2 - 4), a banda (31,7 kDa) correspondente à gluconacina pôde ser verificada com grande intensidade na fração eluída (Figura 9B, Coluna 5). Enquanto no tratamento controle (sem adição de sarcosil) verificou-se a presença da banda correspondente com intensidade muito inferior (Figura 9A, Coluna 5), visto que ocorreram perdas significativas ao longo do processo de purificação (Figura 9B, Colunas 2-4).

Além disso, foi observado que a adição do surfactante sarcosil aumentou a disponibilização da bacteriocina na fração solúvel (Figura 9, Colunas 1), podendo também ter influenciado na maior efetividade da purificação.

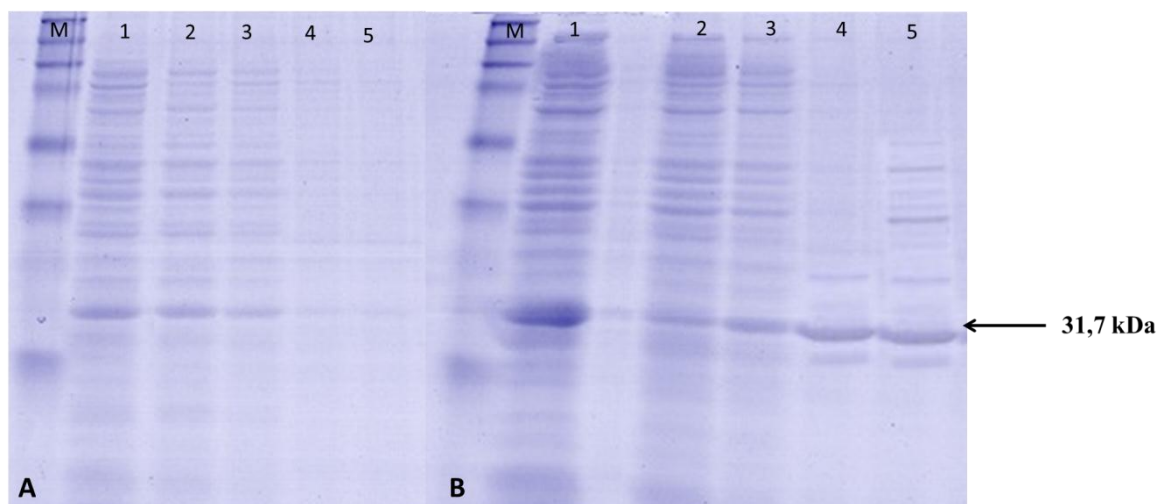


Figura 9 - Perfil eletroforético das amostras coletadas ao longo das etapas de purificação da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa) conforme o Protocolo B de purificação. A) amostra processada e purificada na ausência de sarcosil (controle); B) amostra processada e purificada com sarcosil (10%). Coluna 1: Fração solúvel; Coluna 2: 1º passagem pela coluna de purificação; Coluna 3: 1º lavagem; Coluna 4: 4º lavagem; Coluna 5: eluato. M: Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Cat. No. 10747-012 – Invitrogen™)

Pesquisas envolvendo o estudo de proteínas comumente encontram gargalos nas fases de expressão e purificação. Conforme já mencionado aqui, um desses entraves é a não disponibilização da proteína devido à formação de agregados proteicos insolúveis e inativos, denominados corpúsculos de inclusão (TYEDMERS, MOGK e BUKAU et al., 2010).

Proteínas expressas nessa forma exigem tratamentos adicionais, como solubilização das agregações e re-enovelamento da proteína alvo (GRÄSLUND et al., 2008). Entretanto, tem sido relatado que apesar de serem expressas sob essa forma, algumas proteínas insolúveis ainda retêm sua estrutura e função nativa. Uma abordagem promissora é, portanto, recuperar essas amostras de proteína empregando um surfactante, como o sarcosil (KUDOU et al., 2011; BURGESS, 1996).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência no processo de solubilização de proteínas empregando esse surfactante (CHISNALL et al., 2014; TAO et al., 2010; BURGESS, 2009). A exemplo do estudo desenvolvido por Tao et al. (2010), que obtiveram ressolubilização de 40-70% das proteínas de interesse ao empregar 10% de sarcosil no tampão de lise. Posteriormente, nesse mesmo estudo, os autores conseguiram atingir a solubilização de mais de 95% das proteínas contidas em sedimento totalmente insolúvel. A disponibilização da proteína alvo também ocorreu na presença do mesmo surfactante, após a incubação por 6-24 horas.

O surfactante sarcosil tem propriedades que contribuem para a sua ampla utilização em purificação de proteínas: é não desnaturante, forma micelas de tamanho reduzido, não influencia na medição espectroscópica e é de baixo custo (CHISNALL et al. 2014). Além da capacidade de ressolubilização, tem sido demonstrado também o beneficiamento do processo de purificação por afinidade pela adição de surfactantes.

Tao et al. (2010) observaram melhor rendimento das proteínas RING, Bbox1 e Bbox2, purificadas por cromatografia de afinidade por glutationa (GST), após adição de Triton X-100, CHAPS e sarcosil. Os três surfactantes resultaram em uma ligação significativamente maior da tag GST à resina cromatográfica. Foi observado ainda que os aditivos apresentaram

efeito sinérgico na melhor adsorção da proteína recombinante à resina, e a utilização de Triton X-100 e CHAPS na ausência de sarcosil não demonstraram efeito sobre a adsorção.

Nossos resultados também sugerem o ganho na purificação em função da utilização desse surfactante. Indiretamente, devido à maior disponibilização da gluconacina na fração solúvel, e diretamente, através da maior exposição de sítios ativos de ligação. Embora o protocolo tenha mostrado resultados promissores, ainda foram observadas proteínas contaminantes na fração final, sendo necessários mais ajustes.

b.1) Otimização das concentrações de imidazol no processo de purificação

A avaliação da concentração ótima de imidazol nos tempões de ligação e de lavagem foi realizada com objetivo de reduzir a quantidade de proteínas contaminantes na fração eluída, aumentando assim o grau de pureza do produto final. Conforme demonstrado na Figura 10, a utilização de 5mM de imidazol no tampão de ligação e 30 mM no tampão de lavagem L2 (T2) proporcionou uma menor quantidade de proteínas contaminantes na fração final da purificação.

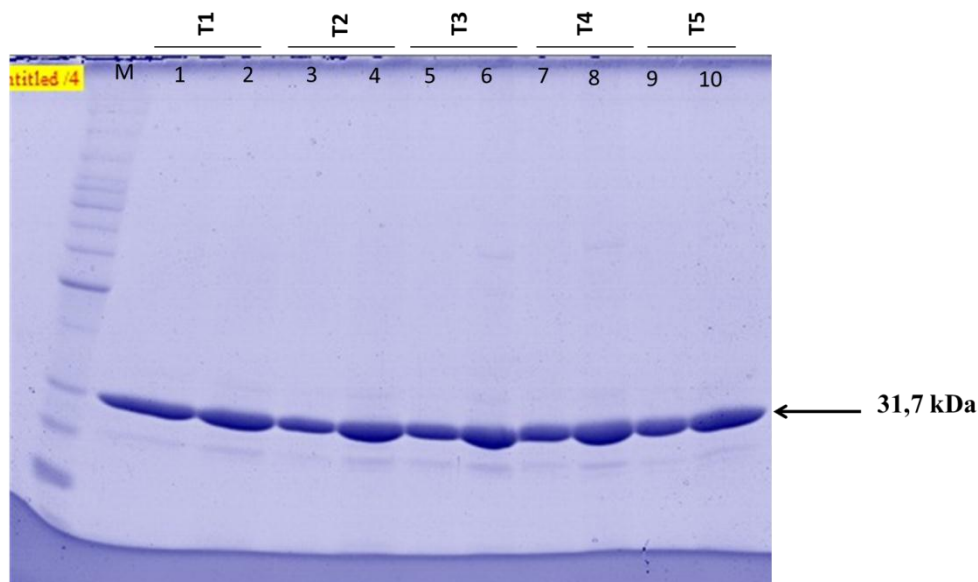


Figura 10 - Efeito da concentração de imidazol nos tampões do protocolo B sobre a eficiência do processo de purificação da gluconacina recombinante (seta: banda correspondente - 31,7 kDa). Tampões de ligação e de lavagem L2, respectivamente. T1: 5mM/ 25 mM; T2 5mM/30 mM; T3: 10mM/ 20 mM; T4: 10 mM/ 25 mM e T5: 10mM/ 30mM. Colunas 1, 3, 5, 7 e 9 correspondem às eluições mais puras de cada tratamento, Colunas 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem às eluições totais de cada tratamento.

Embora esse tratamento tenha possibilitado a obtenção da gluconacina recombinante com maior grau de pureza, na eluição total ainda são observadas bandas correspondentes a proteínas adsorvidas de forma inespecífica (Figura 10, Coluna 4). Com base nisso, fracionamos a eluição em amostras de 1 mL, totalizando assim 5 eluições (5 mL).

Observamos que a primeira eluição, independente do tratamento, trazia grande parte das contaminações, havendo grande redução ou ausência das mesmas nas frações seguintes (dados não mostrados). Dessa forma, a primeira eluição foi desconsiderada, garantindo assim maior grau de pureza do produto final.

Após a reunião das eluições mais puras, os tratamentos T1, T3, T4 e T5, embora em pouca intensidade, ainda apresentaram bandas contaminantes (Figura 10, Colunas 1, 5, 7 e 9). Portanto, o tratamento T2 (5 mM/ 30 mM imidazol; tampões de ligação e lavagem, respectivamente) mostrou-se mais promissor para a obtenção da bacteriocina gluconacina purificada, com um rendimento médio de 1,1 µg/ µL (Tabela 3) .

Tabela 3 - Concentração (µg/µL) das eluições de gluconacina recombinante obtidas sob diferentes concentrações de imidazol nos tampões de ligação e de lavagem.

	T1*	T2*	T3*	T4*	T5*
Eluições mais puras	1,34	1,1	1,25	1,13	0,98
Eluição total	1,67	1,4	1,58	1,4	1,25

*Concentração de imidazol nos tampões de ligação e de lavagem, respectivamente:

T1- 5 mM/ 25 mM; T2- 5 mM/ 30 mM; T3- 10 mM/ 20 mM; T4- 10 mM/ 25 mM; T5- 10 mM/ 30 mM

Proteínas contendo cauda de histidina possuem alta afinidade por Ni²⁺ e outros íons metálicos que podem ser imobilizados em resinas cromatográficas por meio de agentes quelantes (CHEUNG, WONG e NG, 2012). Dessa forma, uma proteína contendo uma *tag* de histidina será seletivamente adsorvida a resinas carregadas de íons metálicos, enquanto outras proteínas não se ligam ou se ligam fracamente. Geralmente, a proteína fusionada com histidina é o ligante mais forte dentre outras proteínas em um extrato bruto (BLOCK et al, 2009; UEDA, GOUT, MORGANTI, 2003).

Pesquisas voltadas à expressão e purificação de proteínas recombinantes comumente usam como estratégia o fusionamento desses resíduos adicionais. Dentre as *tags* de afinidade, a histidina é uma das principais, sendo utilizada em diferentes comprimentos (6-14 resíduos) (MALHOTRA, 2009; BLOCK et al, 2009). A quantidade desses resíduos está diretamente relacionada à força da ligação com a resina cromatográfica. Dessa forma, quanto maior a *tag*, maior a concentração necessária do competidor para que ocorra a eluição (GE HEALTHCARE, 2012). Em função disso, a etiqueta com seis resíduos de histidina, como a utilizada nesse trabalho, é a mais comum, pois assegura uma boa adsorção e possibilita a adição do competidor (imidazol) nos tampões de ligação e lavagem nas concentrações necessárias, diminuindo a interação de proteínas contaminantes (ARNAU et al., 2006).

A presença de resíduos de histidina expostos na superfície de outras proteínas do extrato bruto pode levar à ligação indesejada. Essas proteínas não marcadas podem ser eluídas com a proteína alvo, diminuindo a pureza do produto final. A afinidade da ligação desses contaminantes é frequentemente inferior à ligação da proteína marcada, portanto, é possível removê-las por meio da otimização das concentrações do competidor (GE HEALTHCARE, 2012).

A concentração ideal de imidazol ao longo das etapas de purificação é dependente da proteína alvo. Sendo assim, não existe um protocolo padrão a ser seguido. Richard et al. (2004) obtiveram a bacteriocina divercina V41 purificada empregando 10 mM de imidazol no tampão de ligação e 20 mM e 60 mM nos tampões de lavagem. Nos estudos de Chen et al (2012) a adição de 20 mM do competidor foi suficiente para obter a NB-C1 pura. Para Tang et al. (2017) foi necessária a utilização de uma concentração mais elevada (60 mM) para a efetiva purificação da plantaricina EF.

Normalmente, as concentrações sugeridas em protocolos de purificação estão entre 20 mM e 40 mM. Entretanto, valores inferiores, como o empregado aqui no tampão de ligação, também são relatados (JIANG, LI e GU et al. 2016; PAL e SRIVASTAVA, 2015), reafirmando que a otimização dos parâmetros de purificação é dependente da proteína de interesse.

5.3 Bioensaios para avaliação da atividade antimicrobiana produzida por *G. diazotrophicus*

5.3.1 Indução da produção de substâncias antimicrobianas de *G. diazotrophicus* por H₂O₂

a) Avaliação contra bactérias fitopatogênicas e benéficas

O objetivo das análises prévias do potencial antagonístico da bactéria *G. diazotrophicus* (PAL 5 e MUT GDI_0415) foi realizar uma triagem sobre a inibição do crescimento de bactérias fitopatogênicas ou benéficas. Além disso, tivemos por objetivo indicar se o antagonismo produzido era decorrente da ação da gluconacina ou de outras bacteriocinas produzidas em condições de estresse. Utilizamos aqui a exposição das células de *G. diazotrophicus* ao peróxido de hidrogênio, causando estresse oxidativo.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) precursora da formação do radical hidroxila, que possui grande poder deletério devido sua alta reatividade. Os radicais hidroxila são formados quando moléculas de H₂O₂ atravessam a membrana celular e reagem com íons metálicos como o Cu⁺ e Fe²⁺, através da reação de Fenton. Em função desse grande potencial deletério, o peróxido de hidrogênio funciona como um indutor do sistema “SOS reparo de DNA”. Esse sistema ativa uma proteinase (RecA) responsável pela inativação do repressor (LexA) do gene codificante para bacteriocinas em bactérias Gram-negativas (KAMENŠEK et al, 2010). A utilização desse mecanismo de ativação para a síntese de bacteriocinas já foi demonstrada em outros trabalhos (HAOXIN et al, 2014; DRECHSEL, 2011; DUPUY et al, 2005).

Para as condições de indução da produção de substâncias antagonísticas com H₂O₂, não foi observado antagonismo das estirpes selvagem e mutante de *G. diazotrophicus* (PAL5) contra as demais estirpes de *G. diazotrophicus* analisadas. Muñoz-Rojas, et al (2005), ao avaliar a atividade antagonista entre 55 estirpes de *G. diazotrophicus*, verificaram a ocorrência de resultados positivos de antagonismo em três das sete estirpes (43%) pertencentes ao grupo 3, grupo no qual a estirpe PAL5 está inserida. A divergência de resultados pode ser devido à utilização de indutores diferentes para produção de substâncias antagonísticas. No trabalho citado foi utilizado clorofórmio ao invés de peróxido de hidrogênio, empregado em nossas avaliações. Os compostos antagonísticos produzidos na presença do peróxido de hidrogênio podem ter sido em menores concentrações, sendo insuficientes para exercer o antagonismo observado pelos autores.

Dentre as bactérias fitopatogênicas de cana-de-açúcar analisadas, foram observados halos de inibição contra as bactérias: *X. albilineans*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*; indicando a produção de substâncias que antagonizaram o crescimento desses microrganismos (Figura 11).

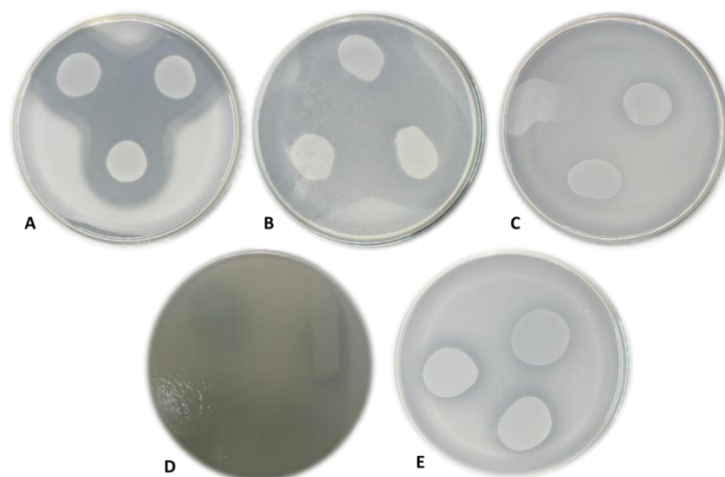


Figura 11 - Antagonismo de *G. diazotrophicus* (PAL5), induzido com H₂O₂, contra as bactérias: A) *X. albilineans*, B) *P. syringae* pv. *syringae*, C) *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, D) *A. avenae* subsp. *avenae*, E) *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

Outros estudos já relataram o antagonismo de *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans* (PIÑÓN et al., 2002; BLANCO et al., 2005; ARENCIBIA et al., 2006, OLIVEIRA, 2013, NIETO-PEÑALVER et al, 2014), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (NIETO-PEÑALVER et al, 2014). Entretanto, o componente responsável pela atividade antagônica não foi identificado ou bem caracterizado (MUTHUKUMARASAMY et al, 2000; ARENCIBIA et al, 2006; MUÑOZ-ROJAS et al, 2005). Nos trabalhos de tese de Drechsel (2011), o antagonismo de *G. diazotrophicus* (PAL5) contra *X. albilineans* foi atribuído à bacteriocina tipo Linocina M18, agora denominada gluconacina. Essa atribuição foi confirmada pela geração de um mutante defeituoso para a produção do peptídeo (MUT GDI_0415). O mutante gerado não apresentou efeito antagônico sobre a bactéria *X. albilineans*.

Entretanto, os resultados aqui encontrados demonstram que a estirpe mutante de *G. diazotrophicus*, MUT_GDI0415, embora em menor intensidade, também produziu substâncias que antagonizaram o crescimento das bactérias *X. albilineans*, *P. syringae* pv. *syringae* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum* (Figura 12). Uma possibilidade para a divergência de resultados é a ocorrência de reversão do fenótipo dada pela instabilidade genética após a inserção do transposon no sítio-alvo. Neste sentido, estudos adicionais devem ser realizados para comprovar ou não a hipótese.

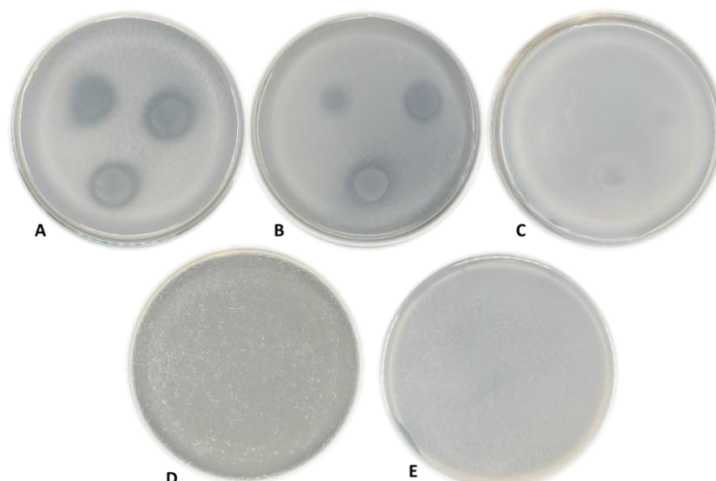


Figura 12 - Antagonismo de *G. diazotrophicus* (MUT GDI_0415), induzido com H₂O₂, contra as bactérias: A) *X. albilineans*, B) *P. syringae* pv. *syringae*, C) *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, D) *A. avenae* subsp. *avenae*, E) *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

b) Avaliação contra fungos

A capacidade de produção de metabólitos secundários de *G. diazotrophicus* (PAL5), sob condições de estresse pela exposição ao peróxido de hidrogênio, também foi avaliada em termos de antagonismo contra fungos fitopatogênicos de cana-de-açúcar e tomate. Os resultados demonstraram que apesar de reduzir o crescimento micelial, não houve incremento do potencial antagonístico da bactéria após a exposição ao indutor (H₂O₂) (Tabela 4, Figuras 13 e 14). As observações sugeriram, portanto, que a submissão do estresse oxidativo não induziu, ou induziu em baixa concentração, a produção de substâncias inibitórias ao crescimento dos fungos avaliados. Apesar disso, foi observada uma redução significativa do crescimento micelial quando o cultivo foi realizado na presença de *G. diazotrophicus* sem a adição do indutor, demonstrando a produção espontânea de compostos capazes de inibir o desenvolvimento dos microrganismos. Os percentuais de inibição nessa condição variaram entre 45 e 67% (Tabela 4).

Tabela 4- Inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos pela presença de substâncias antagonísticas produzidas por *G. diazotrophicus* (PAL5) induzida ou não pela adição de H₂O₂

Fungo	Controle (mm)	PAL5+ H ₂ O ₂	Inibição (%)	PAL5	Inibição (%)
Fitopatogênicos de cana-de-açúcar					
<i>F. moniliforme</i>	82,91a	33,77b	59,27	32,52b	60,78
<i>C. falcatum</i>	53,31a	27,52b	48,38	25,20c	52,73
<i>F. oxysporum</i> sp. <i>lycopersici</i> (Fitopatogênicos de tomate)					
<i>Raça 1</i>	58,09a	35,05b	39,67	26,27c	54,78
<i>Raça 2</i>	56,34a	35,35b	37,26	30,54c	45,79
<i>Raça 3</i>	73,58a	33,05b	55,08	24,21c	67,10

- Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas (P <0,05) de acordo com o teste de Tukey.

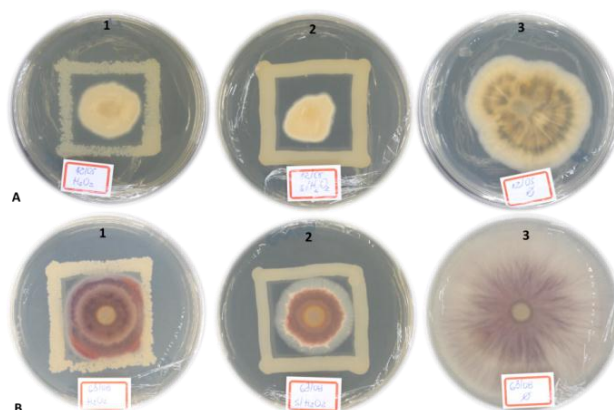


Figura 13 - Inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos de cana-de-açúcar pela presença de substâncias antagonicas produzidas por *G. diazotrophicus* (PAL5) 1- induzida pelo tratamento com H_2O_2 ; 2- sem o tratamento com o indutor, 3- controle sem *G. diazotrophicus* (PAL5) 1- induzida pelo tratamento com H_2O_2 ; 2- sem o tratamento com o indutor, 3- controle sem *G. diazotrophicus*. A) *Colletotricum falcatum*, B) *Fusarium moniliforme*

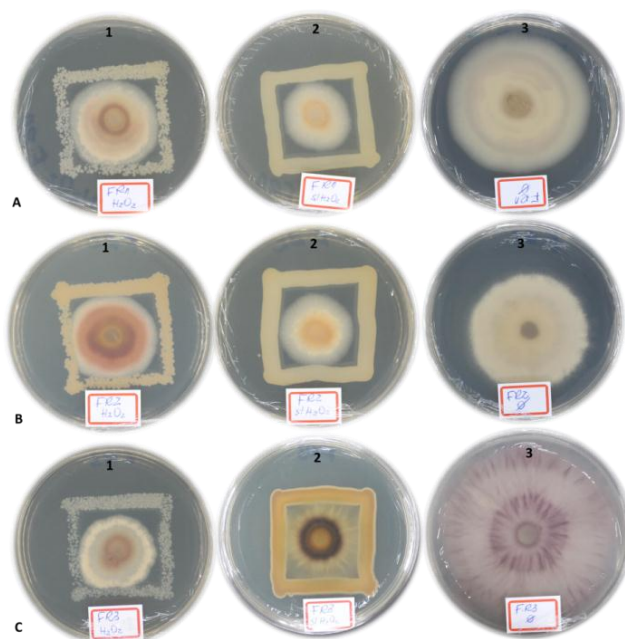


Figura 14 - Inibição do crescimento do fungo fitopatogênico de tomate, *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*, pela presença de substâncias antagonicas produzidas por *G. diazotrophicus* (PAL5) 1- induzida pelo tratamento com H_2O_2 ; 2- sem o tratamento com o indutor, 3- controle sem *G. diazotrophicus*. A) Raça 1; B) Raça 2; C) Raça 3.

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), como *G. diazotrophicus*, afetam o crescimento de plantas de maneiras diferentes, direta e/ou indiretamente. A promoção direta do crescimento ocorre de várias maneiras, como: melhora da absorção de nutrientes, fornecimento de fitohormônios e vitaminas, solubilização de fosfato inorgânico (GURURANI et al. 2013; SACHDEV et al. 2009; MARTINEZ-VIVEROS et al.2010; ALI et al. 2010; BHATTACHARYYA e JHA 2012). A promoção indireta do crescimento das

plantas ocorre quando as BPCV diminuem ou previnem os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos. Isso pode acontecer produzindo substâncias biologicamente ativas ou induzindo resistência a patógenos (BENEDUZI, AMBROSINI e PASSAGLIA, 2012).

Dentre as atividades antagonicas apresentadas, pode-se destacar: 1) competição por nutrientes e colonização de nichos na superfície radicular (KAMILOVA et al. 2005; VALIDOV et al., 2007), 2) regulação dos níveis de etileno através da enzima ACC-deaminase, podendo atuar na modulação do nível de etileno em resposta ao estresse imposto pela infecção (VAN LOON, 2007), (3) produção de sideróforos, antibióticos e bacteriocinas (OLIVERA et.al , 2018; BENEDUZI, AMBROSINI e PASSAGLIA, 2012), e 4) síntese de enzimas hidrolíticas, como quitinases, glucanases, proteases e lipases, que podem lisar células de fungos patogênicos (NEERAJA et al.,2010; MAKSIMOV et al., 2011).

A capacidade inibitória de *G. diazotrophicus* contra fungos já foi relatada sobre *Fusarium oxysporium* (LOGESHWARN et al, 2011) e *Colletotricum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY et al., 2000). Nesse último, o princípio responsável pelo antagonismo não foi identificado. Os autores sugeriram que a atividade antifúngica era decorrente da produção de substâncias antagonistas ou devido à inibição de nutrientes essenciais, causado pela alteração do pH do meio. Já nos trabalhos de Logeshwarn et al, (2011) foi detectada a produção de três antibióticos com grande potencial antifúngico.

Nesse estudo verificamos a capacidade inibitória de *G. diazotrophicus* contra cinco fungos de importância agrícola para as culturas de cana-de-açúcar e tomate. Entretanto, não observamos indícios de que o antagonismo tenha sido devido à produção de bacteriocinas. Apesar de menos recorrente, a atividade antifúngica desses peptídeos antimicrobianos já foi relatada na literatura (BENITEZ et al, 2010; LECLÈRE et al, 2005), demonstrando assim uma grande versatilidade de aplicação.

5.4 Espectro de atuação da bacteriocina gluconacina

A avaliação da atividade antimicrobiana da gluconacina foi realizada contra 25 estirpes bacterianas e 5 fungos. Os resultados indicaram que a bacteriocina não possui efeito antifúngico contra as espécies avaliadas. Entretanto, 22 estirpes bacterianas apresentaram redução parcial ou total do crescimento após a incubação na presença da bacteriocina (Tabela 5). Em relação às bactérias fitopatogênicas, todas as espécies importantes para as culturas de cana-de-açúcar e tomate sofreram uma redução bastante significativa do crescimento. No caso de *X. albilineans*, *X. vasicola* pv. *vasculorum* e *R.solanacearum*, o crescimento foi totalmente inibido.

Em relação às bactérias não fitopatogênicas, houve casos de antagonismo total ou nenhum efeito antagonico (Tabela 5, Figura 15). Por exemplo, a bacteriocina mostrou antagonismo total à maioria das estirpes de *G. diazotrophicus*, representantes de grupos ET diferentes. As exceções foram BR11288 (ET1), BR11280 (ET5), além de uma estirpe de *G. johannae*, pertencente ao mesmo gênero. A análise de outras espécies diazotróficas pertencentes ao inoculante de cana-de-açúcar mostrou inibição total da estirpe CBAmc de *N. amazonense* e menor efeito na Ppe8 de *P. tropica*.

Curiosamente, nenhum efeito da adição de gluconacina foi observado nas estirpes HCC103 e BR11197 de *H. rubrisubalbicans*, e na estirpe HRC54 de *H. seropedicae* (Figura 14). A bacteriocina produzida por *G. diazotrophicus* PAL5 também promoveu redução significativa do crescimento das estirpes Gram positivas pertencentes ao gênero *Bacillus* isoladas de líquido de apoplasto de cana-de-açúcar.

Outra observação realizada ao longo dos bioensaios foi a translucidez das suspensões bacterianas decorrentes do tratamento com gluconacina das bactérias que se mostraram sensíveis à mesma (Figura 16). Esse resultado aponta para a ocorrência de lise celular, sugerindo um mecanismo de ação (OKUDA et al. 2013; O’SULLIVAN, ROSS e HILL, 2002)

Tabela 5 - Espectro inibitório da gluconacina contra bactérias de importância para a cultura canavieira e tomaticultura.

Bactéria	Antagonismo (%)	UFC/mL Controle	UFC/mL Gluconacina *
Gram negativo			
Fitopatogênicas de cana-de-açúcar			
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i> - 179	++	10 ¹¹	10 ⁷
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> - 1983	++	10 ¹¹	10 ⁶
<i>X. albilineans</i> - ICMP196	+++	10 ⁸	0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> - 660	++	10 ⁸	10 ³
<i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> - 1311	+++	10 ¹⁰	0
Fitopatogênicas de tomateiro			
<i>X. perforans</i> - 2370	++	10 ⁹	10 ⁵
<i>R. solanacearum</i> - 292	+++	10 ⁹	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> - 836	+	10 ⁸	10 ⁷
Não fitopatogênicas (diazotróficas e BPCV)			
<i>G. diazotrophicus</i> (ET1)	++	10 ⁹	10 ⁴
BR11247 (ET3)	+++	10 ⁵	0
BR11284 (ET4)	+++	10 ⁷	0
BR11280 (ET5)	+	10 ⁶	10 ⁴
BR11249 (ET6)	+++	10 ⁵	0
BR11237 (ET7)	+++	10 ⁸	0
<i>G. johannae</i> (BR12106)	++	10 ⁸	10 ³
<i>H. rubrisubalbicans</i> (HCC103)	-	10 ¹⁰	10 ¹⁰
BR11197	-	10 ¹⁰	10 ¹⁰
BR11506	+++	10 ⁸	0
BR11192	+++	10 ⁹	0
<i>P. tropica</i> (Ppe8)	+	10 ¹¹	10 ¹⁰
<i>H. seropedicae</i> (HRC54)	-	10 ¹¹	10 ¹¹
<i>N. amazonense</i> (CbamC)	+++	10 ¹¹	0
Gram positivo			
<i>Bacillus</i> LMC 12	++	10 ¹⁰	10 ⁴
<i>Bacillus</i> LMC21	+	10 ⁶	10 ³
<i>Bacillus</i> LMC42	++	10 ⁸	10 ³

Redução na ordem de grandeza de: 10¹ - 10³: +; 10⁴ - 10⁶: ++; inibição total:+++

* Referente à sobrevivência após a incubação na presença da bacteriocina

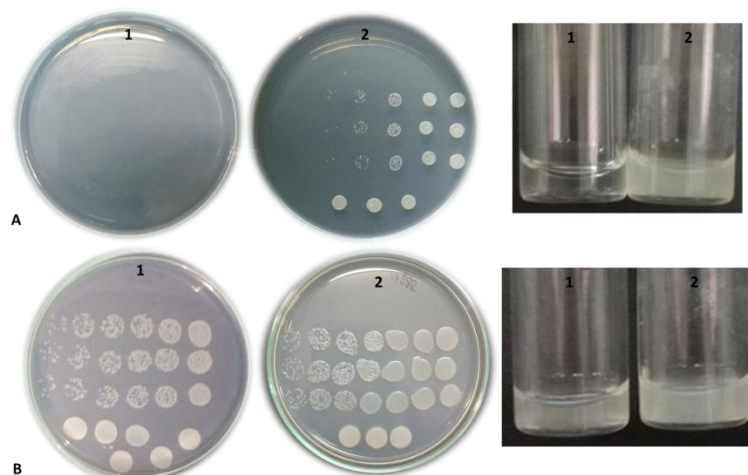


Figura 15 - Efeito da incubação com 1- gluconacina (0,5 µg/µL) e 2- controle (tampão de eluição), sobre bactérias sensíveis e resistentes. A) *X. albilineans* B) *H. seropedicae* HRC54.

A bioatividade de *G. diazotrophicus* contra uma ampla diversidade de microrganismos não é incomum (NIETO-PENÁLVOR et al., 2014; OLIVEIRA, 2013; BLANCO et al., 2010; ARENCIBIA et al., 2006; BLANCO et al., 2005; MUÑOZ-ROJAS et al., 2005; PIÑON et al., 2002). Além disso, a ocorrência de pelo menos três bacteriocinas produzidas por essa bactéria já foi relatada na literatura. Piñon et al. (2002) descreveram uma bacteriocina antagonista de *X. albilineans* com peso molecular 12,5 kDa. Já Muñoz-Rojas et al. (2005) relataram que o responsável pelo antagonismo a outras estirpes de *G. diazotrophicus* é uma bacteriocina de 3,4 kDa. Nos estudos de Blanco et al. (2005) e (2010) foi apresentada uma bacteriocina com atividade “*lisozyme-like*”.

Estes compostos podem ter ação contra espécies intimamente relacionadas (estreito espectro de ação) ou espécies filogeneticamente distantes (amplo espectro de ação) do microrganismo produtor (FIELD et al. 2011). Em nosso estudo, a atividade antagônica da gluconacina purificada foi observada contra bactérias filogeneticamente próximas e distantes a *G. diazotrophicus*, sugerindo um amplo espectro de ação. O foco inicial desse trabalho foi investigar o efeito da bacteriocina gluconacina em bactérias fitopatogênicas que são prejudiciais às plantas de cana-de-açúcar e tomate. Os resultados indicaram que além de *X. albilineans*, a bacteriocina também afetou o crescimento das demais estirpes fitopatogênicas testadas, embora em diferentes graus de antagonismo.

O amplo espectro de inibição sobre tais bactérias é interessante, considerando-se a dificuldade para eliminar ou reduzir o efeito patogênico das mesmas durante o crescimento das plantas. Entre as bactérias intimamente relacionadas, todas apresentaram crescimento variável na presença da gluconacina. Especificamente, a bacteriocina mostrou iso-antagonismo a estirpes de *G. diazotrophicus* pertencentes a tipos eletroforéticos (ET) diferentes. Tais informações precisam ser melhor exploradas considerando-se que essas bactérias diazotróficas são conhecidas por beneficiar a planta (BALDANI e BALDANI, 2005).

A triagem realizada anteriormente demonstrou que mesmo após ocasionar estresse oxidativo, visando induzir a produção de peptídeos antimicrobianos, a estirpe PAL5 não inibiu o crescimento das demais estirpes de *G. diazotrophicus* antagonizadas pela gluconacina purificada. Provavelmente, a concentração de gluconacina naturalmente produzida foi insuficiente para inibir o crescimento das mesmas.

A capacidade antagonista desse agente antimicrobiano sobre espécies fitopatogênicas abre novas oportunidades para aplicações biotecnológicas no campo, conforme a utilização da

bacteriocina agrocina 84, produzida por *Agrobacterium vitis* (sin. *Agrobacterium radiobacter*). Esse peptídeo antimicrobiano possui efeito inibitório contra *A. tumefaciens*, agente causal da galha da coroa em várias espécies (COOKSEY; MOORE 1982; PENYALVER et al. 2009) e é comercializado na Austrália com nome NOGALL™. A formulação é baseada nas estirpes avirulentas (desarmadas) de *A. vitis* e seu uso é restrito a sementes, raízes, caules, frutos e plantas ornamentais em condições controladas (BASF®)

Outros autores discutiram o uso potencial de bacteriocinas semelhantes à colicina na agricultura, mas a limitação tem sido atribuída à falta de pesquisas sobre a diversidade e os mecanismos de ação dessas proteínas em bactérias patogênicas de plantas (GRINTER et al., 2012).

A geração de um produto comercial baseado na gluconacina abre novos horizontes para seu uso como agente antimicrobiano em diferentes plantas. Entre as possibilidades, está a produção de plantas transgênicas expressando o gene da bacteriocina, como sugerido por Grinter et al. (2012) e a utilização de *G. diazotrophicus* como vetor para a superexpressão da gluconacina, como demonstrado por Salles et al. (2000) e Subashini et al. (2011) para genes tipo *cry* com atividade entomopatogênica.

5.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima de gluconacina necessária para inibir o crescimento das estirpes fitopatogênicas sensíveis foi realizada segundo o ensaio proposto por Oliveira et al. (2009). As CMIs encontradas são apresentadas na Tabela 6. De um modo geral, as estirpes de *X. vasicola* pv. *vasculorum* e *X. albilineans* apresentaram maior sensibilidade à bacteriocina. A estirpe *R. solanacearum* apresentou maior resistência quando comparada às primeiras, requerendo o dobro da concentração (0,5 µg/µL) para total inibição do crescimento. Já as demais bactérias (*P. syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *A. avenae* subsp. *avenae*, *P. syringae* pv. *tomato* e *X. perforans*) demandaram a maior concentração para que ocorresse o antagonismo completo, justificando a divergência de resultados encontrados na triagem anterior, cuja concentração empregada foi 0,5 µg/µL.

Tabela 6 - Concentração Mínima Inibitória de gluconacina para as bactérias fitopatogênicas de cana-de-açúcar e tomate

Bactérias	CMI (µg/µL)
Fitopatogênicas de cana-de-açúcar	
<i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>	0,25
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1,0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	1,0
<i>X. albilineans</i>	0,25
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	1,0
Fitopatogênicas de tomate	
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	1,0
<i>R. solanacearum</i>	0,5
<i>X. perforans</i>	1,0

CMI= concentração mínima inibitória (em que não houve crescimento quando comparado ao controle)

Conforme os resultados obtidos, verificou-se que o grau de antagonismo variou entre os microrganismos testados. Essa variação é resultante da diferença nos receptores (sítios de ligação) contidos na superfície celular da bactéria avaliada (JABEEN et al, 2014).

O potencial da gluconacina contra bactérias fitopatogênicas tem alto valor biotecnológico. Sobretudo quando se considera que a única forma de controle das doenças causadas por essas bactérias é a utilização de variedades resistentes aliada à produção de mudas e sementes de alta sanidade (SURESH et al, 2017; MATSUOKA e MACCHERONI 2012).

5.6 Caracterização do efeito antimicrobiano da gluconacina

Com o objetivo de investigar se o modo de ação da gluconacina sobre *X. albilineans* (ICMP196) é bactericida ou bacteriostático, incubou-se a suspensão bacteriana na presença da bacteriocina, e a contagem de células viáveis foi determinada em função do tempo. Verificamos que após a adição da gluconacina, as células do microrganismo indicador foram rapidamente afetadas. O tempo de incubação para a ação da gluconacina foi de 15 minutos (Figura 16). A viabilidade celular foi completamente afetada, não sendo verificada a formação de colônias (Figura 17), caracterizando, portanto, o mecanismo de ação bactericida desse peptídeo antimicrobiano.

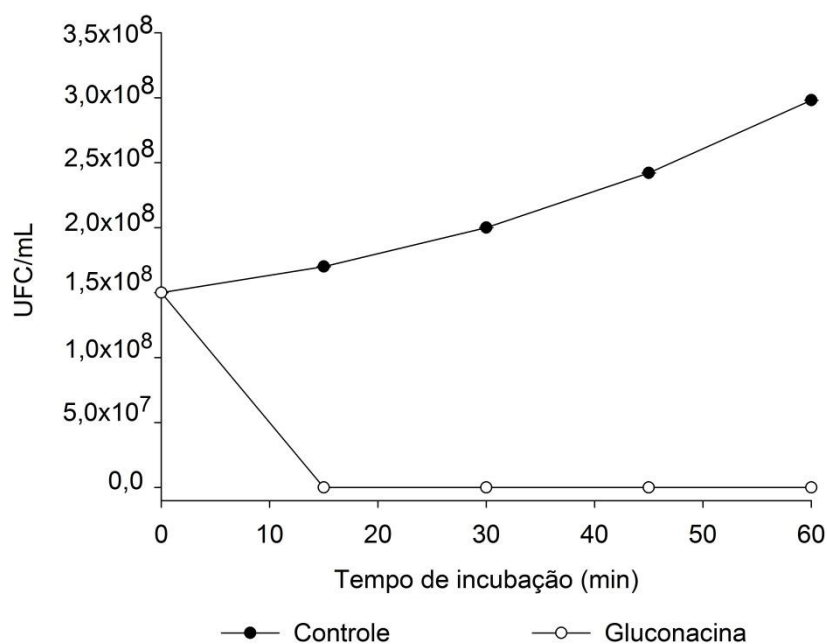


Figura 16 - Efeito bactericida da gluconacina sobre a bactéria *X. albilineans*.

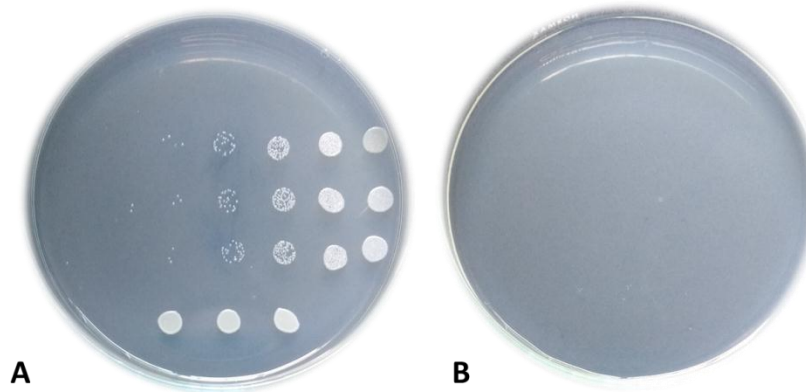


Figura 17 - Contagem de células viáveis de *X. albilineans* após 15 minutos de incubação com A) controle e B) gluconacina.

As análises realizadas por microscopia confocal de varredura a laser ilustraram esse potencial bactericida observado na Figura 15. Nas micrografias é possível verificar a grande alteração morfológica das células de *X. albilineans* tratadas com a bacteriocina quando comparadas às células do grupo controle. As células não tratadas exibiram características típicas, com paredes bem delimitadas e em forma de bastonete (Figura 18 A). Em contraste, as observações realizadas nas células tratadas com a bacteriocina sugeriram rompimento da parede celular, condensação do material nuclear e perda do conteúdo citoplasmático (Figura 18 B), apontando para um mecanismo de ação de lise.

Essas observações corroboram com nossos resultados de mensuração de compostos absorventes de UV. Conforme observado na Figura 18, houve a provável liberação de ácidos nucleicos e proteínas para o meio extracelular após as células serem expostas à gluconacina. O valor de absorbância de ácidos nucleicos (DO_{260nm}) extracelulares de células de *X. albilineans* tratadas com gluconacina aumentou significativamente de 0,0 para 0,43 após 30 minutos de incubação. O comportamento foi semelhante para os valores de absorbância de proteínas (DO_{280nm}) extracelulares (Figura 19).

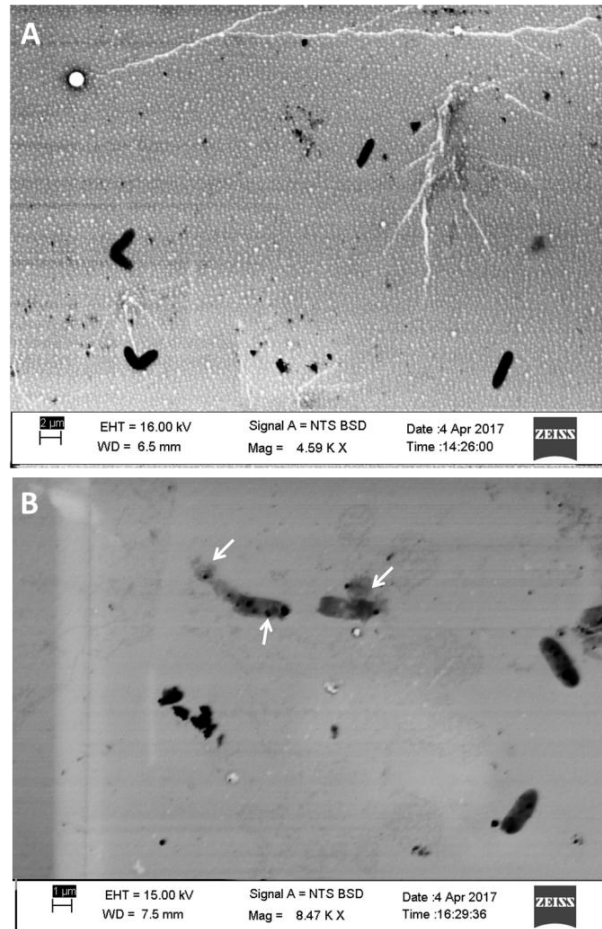


Figura 18 - Efeito da gluconacina sobre a estrutura celular de *X. albilineans*. Células tratadas com A) tampão de eluição (controle); B) gluconacina.

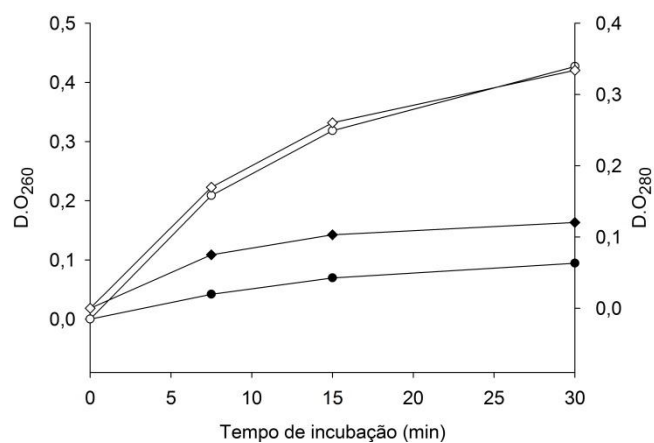


Figura 19 - Materiais extracelulares absorventes de UV de células de *X. albilineans* detectados a 260 nm (● - controle; ○ - gluconacina) e 280nm (◆ - controle; ◇ - gluconacina) ●- $y = 0,0311x - 0,0262 / R^2: 98,35\%$; ○- $y = -0,0251x^2 + 0,2645x - 0,2345 / R^2: 99,6\%$ ◆- $y = -0,0144x^2 + 0,1111x - 0,0949 / R^2:99,92\%$; ◇- $y = -0,0241x^2 + 0,2296x - 0,2024 / R^2: 99,6\%$

O comprometimento da integridade da membrana celular também foi demonstrado nas quantificações de fosfato inorgânico (Figura 20). Nas células não tratadas (controle) as concentrações intracelulares e extracelulares, apesar de se ter observado um pequeno aumento inicialmente, não sofreram alterações óbvias, sendo mantidas as concentrações de 35-40 e 9,0 $\mu\text{mol/L}$ nos níveis intracelular e extracelular, respectivamente. Por outro lado, a concentração extracelular aumentou significativamente nas células incubadas com gluconacina. Os níveis de fosfato inorgânico extracelulares alcançaram 40 $\mu\text{mol/L}$ enquanto as concentrações intracelulares decresceram significativamente logo nos primeiros minutos de exposição (12 $\mu\text{mol/L}$).

Os resultados encontrados em nossas análises sugerem que o mecanismo de ação da bacteriocina gluconacina envolve a alteração da integridade da membrana e aumento da permeabilidade, causando a perda de íons pequenos como o fosfato inorgânico, e culminando em completa lise celular.

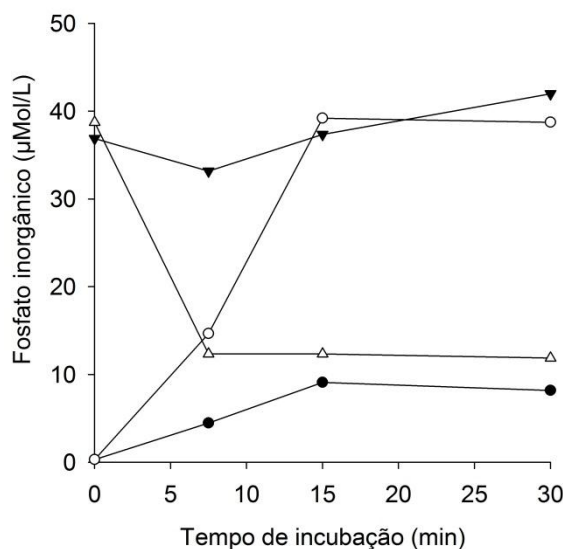


Figura 20 - Concentração de fosfato inorgânico intracelular (▼- controle; △- gluconacina) e extracelular (●- controle; ○- gluconacina) de células de *X. albilineans*. ▼- $y = 2,0833x^2 - 8,4722x + 42,898/R^2 = 0,9297$; △- $y = 6,4815x^2 - 40,463x + 71,37/R^2 = 0,9318$; ●- $y = -1,2731x^2 + 9,1898x - 7,912/R^2 = 0,9624$; ○ $y = -3,7037x^2 + 32,5x - 30,25/R^2 = 0,9434$

O mecanismo de ação comumente relatado para as bacteriocinas consiste no bloqueio da biossíntese da parede celular ou na formação de poros na membrana, resultando no desequilíbrio e lise celular (O'SULLIVAN, ROSS e HILL, 2002). Entretanto, outros mecanismos já foram descritos, como nos estudos realizados por Yi et al (2016), que mostraram que a bacteriocina MN047, além de desencadear a formação de poros na membrana, também inibe a replicação do DNA.

A nisina, uma das bacteriocinas mais estudadas, possui um modo de ação duplo: inibição da síntese da parede celular (efeito bacteriostático) e inserção na membrana, seguido pela formação de poros, que rapidamente mata as células (efeito bactericida). Embora existam dois modos de ação, a formação de poros é considerada o principal mecanismo. Através deste, ocorre uma dissipação da força protomotriz (FMP) através dos poros formados na membrana citoplasmática, privando as células de uma fonte de energia essencial (MONTVILLE e BRUNO, 1994).

A FMP é um gradiente eletroquímico composto pelo potencial transmembrana ($\Delta\psi$) e pelo gradiente de pH (ΔpH), responsável por impulsionar a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos através do acionamento de sistemas de transporte FMP-dependentes. O colapso desse gradiente eletroquímico induzido pela ação das bacteriocinas que possuem esse modo ação, leva à morte celular, primeiramente por meio da cessação de reações que exigem energia (MCAULIFFE, ROSS e HILL, 2001).

Os resultados observados aqui indicam que a gluconacina aumentou a permeabilidade da membrana, possivelmente resultando no colapso da FMP, conforme o descrito na literatura. O efluxo de fosfato inorgânico possivelmente desencadeia a hidrólise de ATP disponível na tentativa de manter a concentração do íon (ABEE, KLAENHAMMER e LETELLIER, 1994; WINKOWSKI, BRUNO e MONTVILLE, 1994). Em função dessa tentativa de manter o funcionamento celular, vários estudos também atribuem à ação das bacteriocinas a diminuição nos níveis de ATP (JIANG et al, 2018; CARVALHO et al, 2018; GONG, MENG e WANG, 2010)

b.1) Análises de microscopia confocal

O potencial bactericida da gluconacina também foi avaliado em microscopia confocal de varredura a *laser*. Tais análises foram realizadas sobre a bactéria *X. axonopodis* pv. *vascolorum* devido à não funcionalidade do kit utilizado (Live/Dead) para células de *X. albilineans*. As avaliações consistiram na utilização de sondas fluorescentes SYTO 9 e iodeto de propídio (PI), que distinguem células intactas das células danificadas em nível de membrana celular. A sonda SYTO 9 geralmente cora todas células bacterianas, enquanto o PI penetra somente quando a membrana bacteriana é danificada, causando uma redução na fluorescência do SYTO 9 quando ambos os corantes estão presentes (MOUSSA, PERRIER-CORNET e GERVAIS, 2007).

Dessa forma, as células bacterianas com membranas intactas excluem o corante PI, mas serão coradas pelo SYTO 9, emitindo fluorescência verde, enquanto as células bacterianas com uma membrana danificada serão coradas pelo PI e emitem fluorescência vermelha. Como mostrado na Figura 20, a incubação de células de *X. axonopodis* pv. *vascolorum* com a bacteriocina por 4 horas demonstrou uma transição de fluorescência verde para vermelha, indicando, possivelmente, danos nas membranas de células ainda vivas (Figura 21 B). Após 24 horas de tratamento, não foram verificados pontos de transição de cor, sendo observada somente a emissão da fluorescência vermelha (Figura 21 D). Estes resultados sugerem que a destruição das membranas celulares foi um processo progressivo durante a exposição à gluconacina.

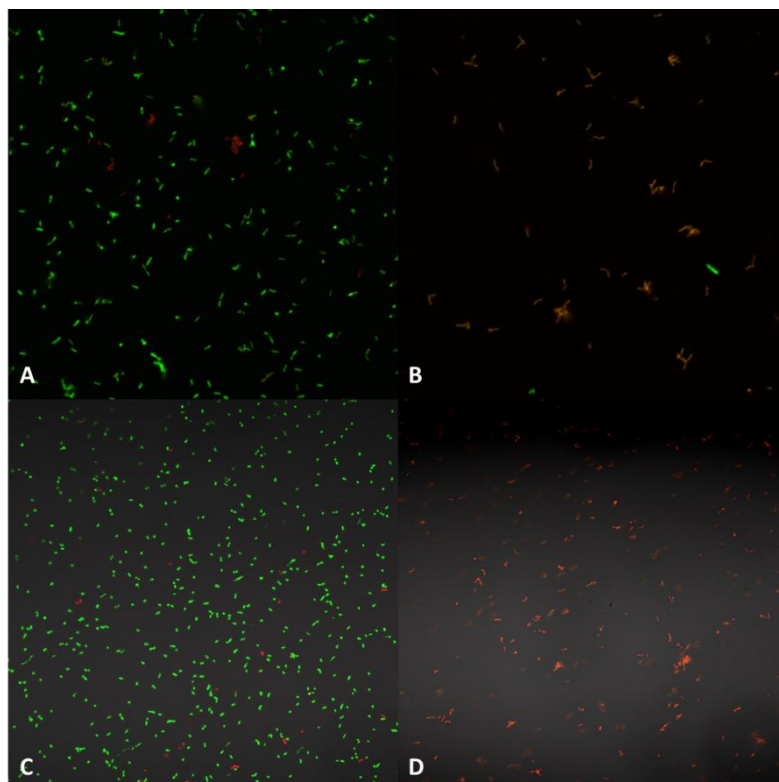


Figura 21 - Micrografias confocal de varredura a laser de células de *X. axonopodis* pv. *vasculorum* incubadas sem (A-C) e com gluconacina (B-D) por 4 e 24 horas

5.6.1 Caracterização físico-química da gluconacina

Diferentes fatores físicos e químicos podem ter significativo impacto na bioatividade de bacteriocinas. Para a caracterização físico-química, a gluconacina purificada por cromatografia de afinidade foi testada quanto à sensibilidade a pH, ação de enzimas proteolíticas e glicolíticas, temperatura e presença de surfactantes. Como mostrado na Tabela 7, a conservação da atividade (>60%) foi maior em pH ácido. Em contrapartida, a atividade antibacteriana residual (<11%) diminuiu significativamente em pH alcalino.

Os resultados sugeriram também que a gluconacina possui alta estabilidade (>93%) em temperaturas elevadas por até 60 min de exposição, e sob autoclavagem por 15 min (99,46%). Com relação aos tratamentos com enzimas proteolíticas, foi observada significativa redução da atividade (>50%) da gluconacina quando submetida à digestão com lisozima, pepsina e proteinase-K. Em adição, também houve redução da atividade, embora em menor grau, quando realizada a digestão com α -amilase e tripsina (Tabela 7).

A exposição da gluconacina à uréia e Tween-20 resultou em completa retenção da atividade. Já nas amostras tratadas com Tween-80, Triton-100 e SDS a atividade residual decresceu para 86,24, 22,4 e 9,5%, respectivamente. Houve completa inativação da atividade antimicrobiana nas amostras tratadas com EDTA.

Tabela 7 - Efeitos de pH, enzimas, surfactantes e temperatura sobre a atividade antibacteriana da gluconacina

Tratamento	Duração	Halo (mm)	A.R (%)**
<i>pH</i>			
2	1 h	10,05 ^c	69,22
4		10,95 ^b	84,60
6		11,18 ^a	88,64
7,4 (controle)		11,85 ^a	100
10		6,65 ^d	11,25
12		6,56 ^d	9,12
<i>Enzima</i>			
Controle	2 hrs	11,43 ^a	100
Proteinase-K		8,64 ^{cd}	48,59
α -amilase		9,28 ^{bc}	60,46
Tripsina		10,33 ^{ab}	79,79
Lisozima		7,47 ^d	27,2
Pepsina		8,08 ^{cd}	38,4
<i>Surfactante</i>			
Controle	2 hrs	11,35 ^a	100
SDS		0,5 ^c	9,5
Uréia		11,67 ^a	105,92
Triton X-100		8,54 ^b	22,4

EDTA		0 ^c	0
Tween-80		10,61 ^a	86,24
Tween-20		11,68 ^a	106,2
<hr/>			
<i>Temperatura (°C)*_{NS}</i>			
45	15 min	11,48	102,39
45	30 min	11,24	100,59
45	45 min	11,44	103,29
45	60 min	11,33	95,6
60	15 min	11,43	101,97
60	30 min	11,71	104,84
60	45 min	11,10	100,16
60	60 min	11,19	94,35
80	15 min	11,34	101,17
80	30 min	11,21	100,29
80	45 min	10,86	98,00
80	60 min	11,28	95,00
100	15 min	11,42	101,87
100	30 min	11,34	101,47
100	45 min	11,15	100,64
100	60 min	11,07	93,36
121	15 min	11,15	99,46

- Letras minúsculas diferentes nos valores de halos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

*NS: Não significativo

** AR (%) = $((Ht-6)/(Hc-6)) \times 100$; onde: Ht - Halo (mm) produzido pela bacteriocina submetida ao tratamento.
Hc: Halo (mm) produzido pela bacteriocina não submetida ao tratamento (Controle).

A sensibilidade da gluconacina aos tratamentos enzimáticos realizados sugere a natureza proteica do composto. Além disso, a redução (39,54%) na atividade antibacteriana após a digestão com α -amilase aponta para a presença de um grupamento carboidrato importante para o desempenho do antagonismo. Outros estudos, ao realizarem a caracterização de bacteriocinas, também relataram a redução (GE et al, 2016) e inativação do peptídeo após esse tratamento enzimático (KANG e KIM, 2010; POKUSAEVA et al, 2009; SHEHANE e SIZEMORE, 2002).

Embora o tratamento com proteases e a previsão de redução da atividade antibacteriana seja um passo comumente empregado para a confirmação da natureza proteica, vários relatos demonstram que bacteriocinas apresentam variações na sensibilidade a enzimas proteolíticas (LIU et al, 2015; FONTOURA et al, 2009). Naz et al., 2009, por exemplo, confirmaram a natureza peptídica da Piocina SA189 ao longo do seu experimento. Entretanto a bacteriocina foi resistente a todas as enzimas proteolíticas testadas. Essa variação pode ocorrer devido à estrutura terciária das proteínas, tornando-as resistentes à digestão por proteases (BIZANI e BRANDELLI, 2002).

Outra característica importante observada em nosso estudo foi a estabilidade da gluconacina em pHs ácidos e frente a temperaturas elevadas, inclusive sob condições de autoclavagem. Tais características são relevantes e complementam perspectivas para uma formulação de uso agrícola. Uma grande variedade de bacteriocinas apresenta estabilidade em pH 2,0 - 6,0 e redução da atividade em condições alcalinas (DU et al. 2018; ZHAO et. al,

2016; Yi et al, 2016; VIGNOLO et al., 1995). Por outro lado, também existem relatos de bacteriocinas estáveis em faixas de pH mais ampla, como a bifidocina A, estável do pH 2,0 - 10,0 (LIU et al., 2015), ou a carotovoricina NA5, que mantém o efeito inibitório do pH 2,0 - 14,0 (NAZ et al. 2009).

A estabilidade termal também é uma característica bem variável dentre as bacteriocinas. A paracina 1.7 estudada por Ge et al. (2016) conservou >95% da atividade antibacteriana em temperaturas de 40-100°C por 20 minutos. Já a linocina M18 perdeu completamente o efeito inibitório após 5 minutos a 80° C (VALDÉS-STAUER e SCHERER, 1994). Em estudos *in silico*, nossa equipe verificou semelhança entre a gluconacina e a linocina M-18, produzida por *Brevibacterium linens*. Curiosamente, algumas das características físico-químicas as diferem. A linocina M18 apresentou estabilidade frente a uma maior variação de pH (3-12). Por outro lado, a bacteriocina demonstrou instabilidade frente a altas temperaturas, enquanto a gluconacina reteve o potencial antibacteriano mesmo após condições de autoclavagem.

5.7 Ensaios de biocontrole sob condições de casa de vegetação

5.7.1 Proteção de mudas de tomateiro contra murcha-bacteriana (*R. solanacearum*)

Para simular a infecção natural, as raízes das plantas de tomate, após serem lavadas, sofreram cortes (1 cm) e foram imersas por 3 minutos na suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10^8 células/mL do fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*. Apesar de viabilizar a entrada da bactéria, as plantas não apresentaram o sintoma de murchamento foliar ao longo de todo período avaliativo (Figura 22 A). Após 15 dias da inoculação foi observado o surgimento de raízes adventícias em algumas plantas (Figura 22 B).

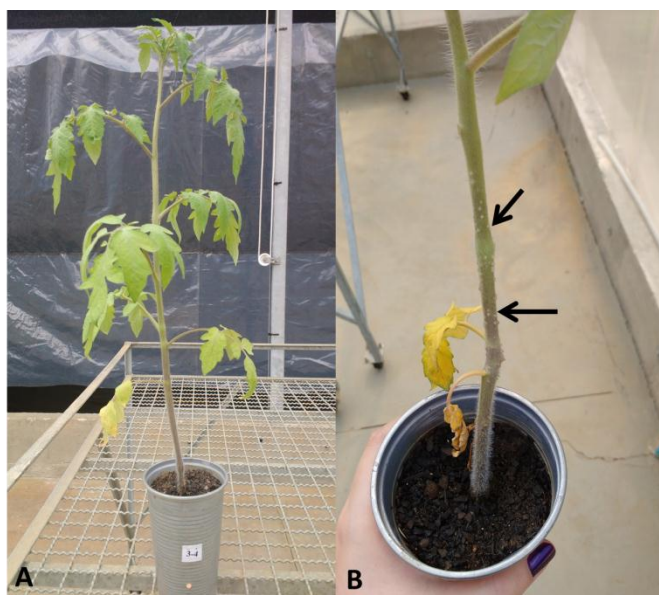


Figura 22 - Plantas de tomate aos 20 dias após a inoculação com o patógeno *R. solanacearum*, estirpe 292. A) Planta assintomática; B) Desenvolvimento de raízes adventícias

Foi realizado o teste do copo (LOPES; ROSSATO, 2013) com os explantes dos caules de algumas plantas inoculadas, e observou-se a exsudação de pus bacteriano, conforme

descrito na literatura. O plaqueamento da exsudação em meio Kelman com tetrazólio possibilitou o desenvolvimento de colônias fluidas, irregularmente arredondadas, opacas e completamente vermelhas (Figura 23).



Figura 23 - Colônias originadas da exsudação de explantes de plantas inoculadas com *R. solanacearum*, estirpe 292, em meio Kelman com tetrazólio.

Apesar do meio Kelman não ser seletivo para *R. solanacearum*, é comumente utilizado para auxiliar na diferenciação de colônias virulentas das avirulentas. Kelman; Jensen (1951) observaram que em meio de cultura contendo tetrazólio, as colônias normalmente mais virulentas são mais lisas, fluidas, irregularmente arredondadas, brancas ou levemente avermelhadas no centro, e as mutantes avirulentas, completamente vermelhas, conforme as reisoladas nesse estudo. Tais diferenças entre os tipos de colônias e níveis de virulência estão relacionadas à presença e quantidade de um mucopolissacarídeo extracelular da bactéria. Esse fitopatógeno apresenta grande variação e a maioria dos isolados perde facilmente a patogenicidade quando mantido em meio de cultura, sendo esse fenômeno relacionado a mutações que levam à variação da morfologia de colônia (KELMAN; SEQUEIRA, 1965).

A grande diversidade fenotípica de *R. solanacearum* era tradicionalmente traduzida em raças, com base na capacidade de atacar diferentes hospedeiros, ou em biovars, baseado na capacidade diferencial de usar certos açúcares e álcoois como fontes de carbono (HAYWARD, 1991). Recentemente, Fegan e Prior (2005), com base em estudos moleculares, solidificaram a ideia de que *R. solanacearum* é um complexo específico, e propuseram uma nova classificação genética contendo quatro níveis taxonômicos, equivalentes a espécies, subespécies, grupos infra-subespecíficos e linhagens clonais. Nessa nova proposta de classificação, o termo “filotipo” é empregado para designar grupos maiores no nível de subespécies, pelo uso de PCR multiplex, e o termo “sequevar” é usado para designar grupos infra-subespecíficos baseados no sequenciamento do gene de endoglucanase. No Brasil, o tomateiro é atacado principalmente pela raça 1 (biovars 1 e 3), referentes aos filotipos 2 e 1, respectivamente, embora haja relatos também da raça 3 (biovar 2 e 2T), referente ao filotipo 2 (LOPES e ROSSATO, 2013).

O aparecimento dos sintomas de murcha inicia-se nas folhas superiores e, em condições favoráveis à doença, ocorre dentro de poucos dias após a infecção. Os sintomas podem surgir em qualquer estágio de desenvolvimento, entretanto, a murcha total é mais frequente quando a infecção ocorre em plantas mais jovens. Além do sintoma de murchamento das folhas, também é relatado a epinastia dos pecíolos e o desenvolvimento de raízes adventícias em tomateiros infectados (AGRIOS, 2005), conforme o observado nesse trabalho.

Segundo Goto (1992), as plantas infectadas com isolados pouco virulentos não murcham, mas apresentam sintomas de nanismo e formação de raízes adventícias. Com base nas informações vistas na literatura, supõe-se que a) o patógeno utilizado nesse trabalho é pertencente a uma biovar pouco virulenta ou b) sua patogenicidade foi perdida ao longo do tempo.

5.7.2 Proteção de mudas de tomate contra mancha-bacteriana (*X. perforans*)

Nas avaliações para verificação do espectro de ação da gluconacina sobre fitopatógenos de tomateiro, verificamos o amplo potencial antagonico contra as estirpes testadas. Na presente avaliação, o objetivo foi avaliar *in vivo* a inibição observada a nível laboratorial. Para isso, foram realizados ensaios de biocontrole em plantas de tomateiro inoculadas com um agente causal da mancha-bacteriana, *X. perforans* - 2370, sob condições de casa de vegetação.

A inoculação do patógeno foi feita por pulverização, e a permanência das plantas em câmara úmida por 24 horas antes e após esse procedimento, possivelmente, favoreceu sua entrada através da abertura dos estômatos. Uma hora antes da inoculação das plantas com o patógeno, foi realizada a aplicação por pulverização da gluconacina, e a evolução da doença foi acompanhada aos 7, 10, 13 e 16 DAI. As avaliações foram realizadas sob três perspectivas (I- número de lesões; II- porcentagem de folhas sintomáticas e III- porcentagem de folíolos sintomáticos) com o objetivo de encontrar a melhor forma de expor os resultados.

Os sintomas característicos da mancha-bacteriana, tais como lesões encharcadas de água, que posteriormente tornam-se marrons escuras e necróticas foram mais evidentes nas plantas infectadas pelo patógeno e não tratadas com gluconacina (Figuras 24 e 25). Dez dias após a inoculação, algumas plantas apresentaram o desprendimento da área necrótica, resultando em perfurações, característica típica causada por essa espécie de *Xanthomonas* (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

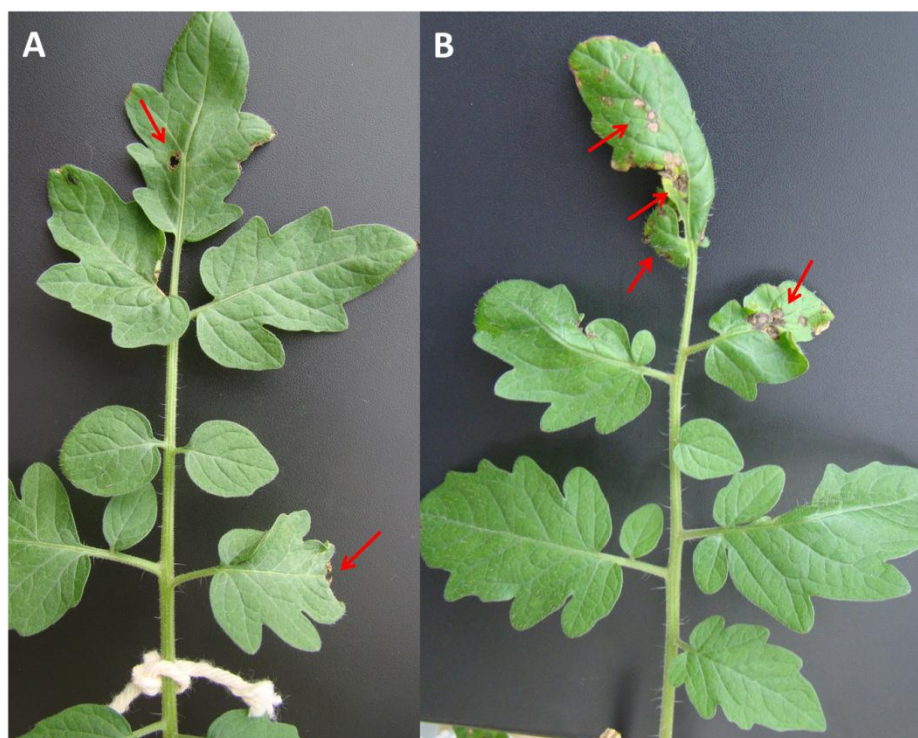


Figura 24 - Eficácia da aplicação de gluconacina na redução de lesões (setas) causadas pelo patógeno *X. perforans*, estirpe 2370. A) planta tratada; B) planta não tratada (controle)

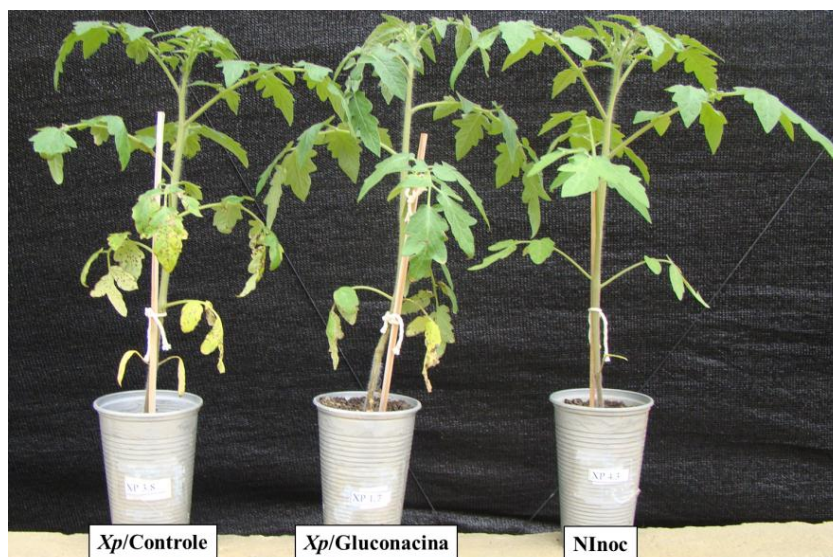


Figura 25 - Variação na severidade da mancha bacteriana causada por *X. perforans* (estirpe 2370) em plantas inoculadas e tratadas com tampão de eluição (controle), gluconacina e não inoculadas com o patógeno (controle negativo)

O tratamento das plantas com gluconacina reduziu significativamente os sintomas da mancha-bacteriana com relação às testemunhas (tampão de eluição e solução salina) em todas as formas de avaliação (Figuras 26 e 27). A severidade da doença nas plantas tratadas, demonstrada na área abaixo da curva de progresso da doença, foi reduzida em 66,4% no número de lesões e 14,7% no número de folhas afetadas (Tabela 8). Como esperado, os tratamentos das plantas com tampão de eluição (controle 1) e solução salina (controle 2) não tiveram efeito sobre o progresso da mancha-bacteriana. O tratamento com o tampão de eluição foi incluído como controle para isentar a possibilidade de influência sobre a redução dos sintomas da doença, visto que pequenas reduções na severidade foram previamente atribuídas aos tampões utilizados (MOSS et al., 2007).

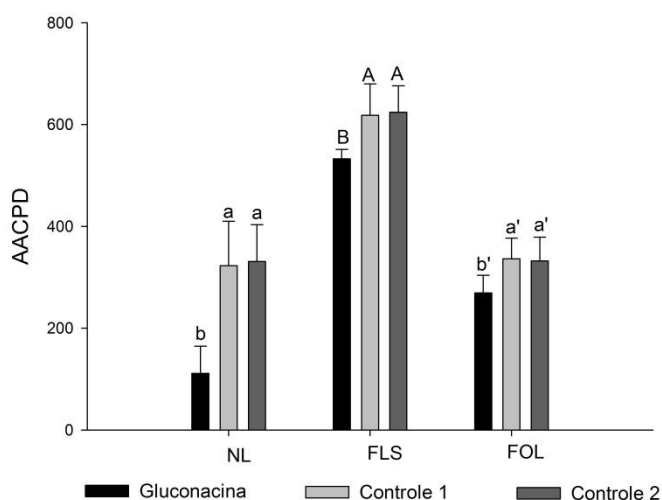


Figura 26 - Área abaixo da curva de progresso da doença mancha-bacteriana de plantas tratadas com gluconacina, tampão de eluição (controle 1), solução salina (controle 2). NL- n° de lesões; FLS- porcentagem de folhas sintomáticas; FOL- porcentagem de folíolos sintomáticos.

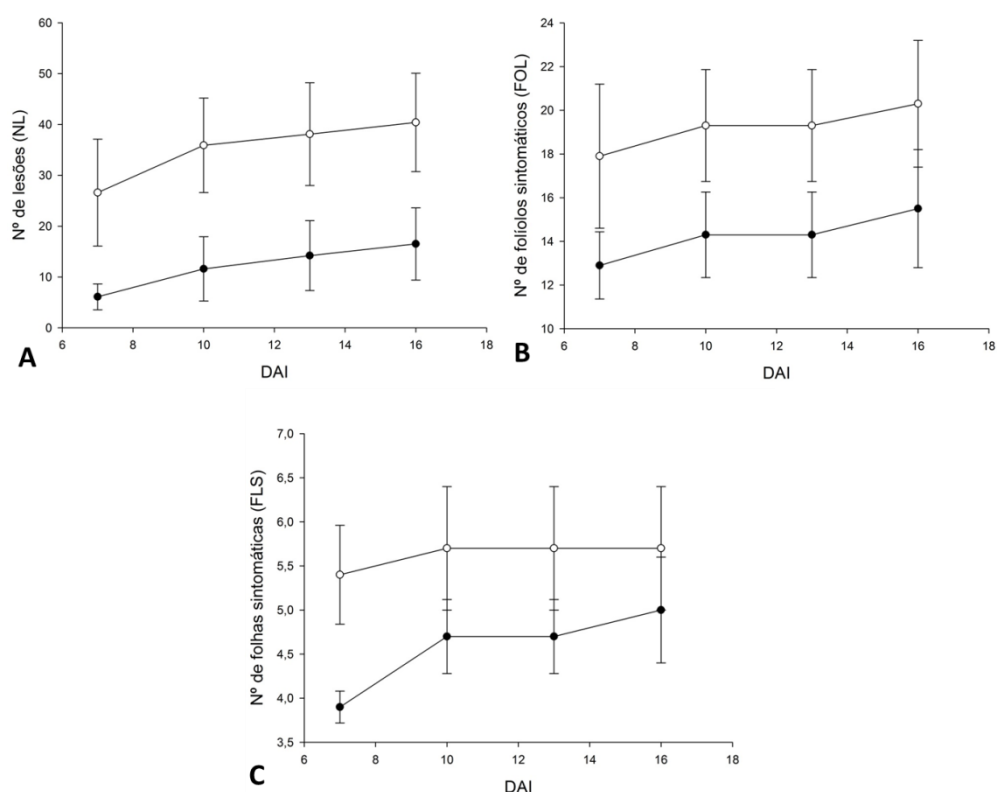


Figura 27 - Evolução da doença mancha-bacteriana ao longo de 16 DAI. Avaliações feitas segundo: A) Número de lesões; B) nº de folhas sintomáticas e C) nº de folíolos sintomáticos. Tratamento com : ● – gluconacina; ○ – controle (tampão de eluição).

Tabela 8 - Severidade (AACPD) da mancha-bacteriana em tomateiros tratados com gluconacina, tampão de eluição (controle 1) e solução salina (controle 2)

Tratamentos	I	% Controle	II	% Controle	III _{NS}	% Controle
Gluconacina	111,3 ^b	66,4	532,8 ^b	14,7	269,2	18,9
Controle I	322,5 ^a	-	618,2 ^a	-	336,2	-
Controle II	331,1 ^a	-	624,2 ^a	-	331,9	-
CV (%)	35,4		9,7		16,3	

I- Número de lesões; II- porcentagem de folhas sintomáticas; III- porcentagem de folíolos sintomáticos

- Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

*NS: Não significativo

O desenvolvimento de alternativas para o uso de pesticidas químicos no controle de doenças de plantas é um desafio contínuo para alcançar a sustentabilidade na agricultura. As bacteriocinas têm sido demonstradas nessa perspectiva como uma alternativa promissora a tais compostos (SUBRAMANIAN e SMITH, 2015; JABEEN et al. 2014). Esses peptídeos antimicrobianos, em função do seu potencial de aplicação nas indústrias agrícola, alimentícia e farmacêutica, são amplamente estudados como perspectivas naturais (CHIKINDAS et al., 2018; AHMAD et al., 2017; LÓPEZ-CUELLAR, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ e CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, 2016). Podem ser altamente específicos, econômicos, ecologicamente amigáveis, sendo excelentes candidatos para o uso agrícola no controle de patógenos de plantas.

O potencial biotecnológico das bacteriocinas tem sido demonstrado contra vários fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2018; NAZ et al., 2015; BERIĆ et al., 2012; KYEREMEH, et al., 2000). Entretanto, a aplicação direta desses agentes antimicrobianos em plantas ainda é pouco explorada. Príncipe et al. (2018) avaliaram a eficácia da bacteriocina tailocina, produzida por *P. fluorescens* SF4c, no controle da mancha-bacteriana causada por *X. vesicatoria*. Foi verificado que a bacteriocina reduziu em 44% a severidade da doença. No presente trabalho, vimos que a gluconacina foi capaz de reduzir 15% das folhas afetadas e 66% do número de lesões nas plantas.

O gênero *Xanthomonas* sp. é responsável por problemas relevantes em várias culturas (JACQUES et al., 2016; HAYWARD, 1993). A espécie *X. perforans*, juntamente com *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, e *X. gardneri* são responsáveis por causar a mancha-bacteriana, uma das doenças mais severas em pimentão e tomate, especialmente em regiões de clima quente e úmido (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010). O grande impacto causado por essa doença é devido à redução da produtividade causada pela destruição foliar, com consequente perda da superfície fotossintetizante, além de prejuízos secundários como a exposição dos frutos à queima pelo sol (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005).

A mancha-bacteriana é uma doença de difícil controle, e diversos fatores contribuem para isso: eficiência variável do controle químico, pouca disponibilidade de produtos comercializáveis, indisponibilidade de cultivares com resistência adequada, rápida disseminação sob condições favoráveis e alta taxa de transmissão por sementes (LOPES; QUEZADO-SOARES, 2000).

Até o momento, o controle da mancha-bacteriana tem sido feito com bactericidas à base de cobre (QUEZADO-DUVAL, LOPES, 2010). Entretanto, sua eficiência vem decrescendo devido ao surgimento de estipes tolerantes (BEHLAU et al., 2013). Outra desvantagem de bactericidas à base de cobre são os impactos negativos sobre a saúde humana e animal (BUTTNER et al., 2017). Paret et al., (2013) na busca de alternativas, avaliaram a eficiência de nanomateriais no controle de manchas-bacterianas, e obtiveram uma redução significativa na severidade da doença. Porém, esse composto apresentou fitotoxicidade, limitando assim sua comercialização (POTNIS et al., 2015). Em função desses entraves, a demanda por recursos biológicos, como bactérias antagonicas, indução de resistência, metabólitos secundários, para substituir as práticas agrícolas convencionais, vem crescendo exponencialmente (HUANG et al., 2012; BAE et al. 2012; LANNA-FILHO, ROMEIRO e ALVES, 2010).

Nesse contexto, as bacteriocinas vêm ganhando destaque e abrem grandes perspectivas para a redução do uso de bactericidas químicos. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a bacteriocina gluconacina, produzida por *G. diazotrophicus*, possui grande potencial para ser empregado como um biocontrolador alternativo da mancha-bacteriana, além de abrir portas para o controle das doenças de cana-de-açúcar e tomate, cujos fitopatógenos foram por ela antagonizados *in vitro*. Estudos posteriores devem ser realizados para alcançar formulações válidas de gluconacina para garantir a eficácia adequada sob condições naturais. Somado a isso, a construção de plantas transgênicas expressando o gene da bacteriocina é sugerida também como outra estratégia promissora no combate à fitopatógenos.

6 CONCLUSÕES

- O maior nível de expressão da gluconacina ocorreu quando o cultivo da bactéria hospedeira foi realizado em meio LB a 25° C com 4 horas de indução da expressão. E sua purificação, por IMAC, obteve melhor resultado empregando sarcosil na solubilização da amostra, 5 mM e 30 mM de imidazol nos tampões de ligação e lavagem respectivamente.
- Os bioensaios de triagem demonstraram que a bactéria *G. diazotrophicus* possui atividade antagonista sobre bactérias e fungos fitopatogênicos de importância para as culturas de cana-de-açúcar e tomate.
- A bacteriocina gluconacina purificada apresentou amplo espectro de atuação, afetando o crescimento de bactérias fitopatogênicas e benéficas.
- A bacteriocina gluconacina possui estabilidade sob altas temperaturas e pH's ácidos. Foi verificada redução da atividade antibacteriana após a digestão com enzimas proteolíticas e exposição a alguns surfactantes.
- Gluconacina possui efeito bactericida, tendo como mecanismo de ação a criação de poros na membrana plasmática seguido de lise celular.
- A aplicação de gluconacina em plantas de tomate inoculadas com *Xanthomonas perforans* reduziu a severidade da doença mancha-bacteriana.

7 PERSPECTIVAS

Os avanços nas pesquisas voltadas às bacteriocinas demonstram que esses peptídeos antimicrobianos possuem potencial de aplicação em várias áreas. Na agricultura, seu potencial biotecnológico contra fitopatógenos de importância econômica faz com que seja elencado como um candidato promissor na busca da sustentabilidade. Apesar de vários estudos demonstrarem a aplicação das bacteriocinas contra fitopatógenos, a avaliação direta desses agentes antimicrobianos em plantas ainda é incipiente.

Nesse estudo, a demonstração da habilidade da bacteriocina gluconacina em reduzir a severidade da mancha-bacteriana em plantas de tomate abre perspectivas para a avaliação do controle de doenças de importância econômica para as culturas de cana-de-açúcar e tomate, cujos agentes causais foram inibidos *in vitro* por sua ação antimicrobiana. Somado a isso, outra característica a ser avaliada é a capacidade desse peptídeo em induzir a resistência em plantas, visto que tal potencial também tem sido atribuído às bacteriocinas. Esses atributos constituem pontos de destaque ao ser considerado o desenvolvimento de um produto biotecnológico para uso em escala comercial. Ressaltando ainda, que a alta estabilidade da atividade biológica da gluconacina frente a altas temperaturas pode representar uma característica versátil ao considerar que ainda neste século é esperado um acréscimo da temperatura global de 2°C a 5,8°C, segundo o 4º Relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC).

A disponibilidade de bacteriocinas no mercado ainda é escassa e são, na maioria, voltadas à área de conservação de alimentos, como a nisina e a pediocina, comercializadas como preservativos alimentares sob os nomes Novasin e ALTA™ 2431, respectivamente. Na agricultura, a disponibilidade comercial desses agentes antimicrobianos é ainda menor, sendo a agrocina 84 o único exemplo até o momento. Essa bacteriocina é comercializada na Austrália como Nogall™ (BASF) em combate à galha da coroa. Entretanto, a aplicação é restrita a sementes, caules e raízes de nozes, amêndoas e rosas, em viveiros.

A baixa diversidade de produtos comerciais contendo bacteriocinas como ingrediente ativo se deve a uma soma de fatores: elevado custo de produção, ausência de um sistema de purificação padrão, havendo necessidade protocolos individuais para a bacteriocina de interesse, tornando o processo laborioso, e implicações quanto à regulamentação. Apesar dos entraves, os avanços nas pesquisas vêm demonstrando que as bacteriocinas constituem uma alternativa promissora em várias áreas, sobretudo na agricultura, onde sua utilização pode oferecer direcionamento de controle sobre a praga-alvo, além de refletir na menor utilização de compostos químicos.

A eficiência da terapia contra a infecção de plantas baseada em agentes de controle biológico depende não apenas da suscetibilidade da bactéria alvo, mas também das condições ambientais que podem afetar a estabilidade desses agentes, sendo a baixa estabilidade uma grande desvantagem para a aplicação no campo. Dessa forma, torna-se necessária a investigação da conservação da atividade biológica da gluconacina frente a alterações das condições ambientais, como: exposição à luz solar e fluídos do apoplasto da planta e dessecação. Nesse viés, também é ressaltada a importância do estudo visando o desenvolvimento de formulações adequadas que possibilitem maior estabilidade da atividade biológica e aumentem a eficácia do biocontrole através de sistemas de entrega inteligente, visando principalmente o direcionamento do antagonismo aos microrganismos alvo. Outra possibilidade que pode ser vislumbrada é superexpressão regulada da gluconacina em *G. diazotrophicus*, driblando a necessidade do fator de indução e aumentando a área de contato desta bacteriocina com fitopatógenos endofíticos.

Nesse contexto, as informações obtidas neste trabalho são pioneiras, principalmente, por demonstrarem o espectro de atuação da bacteriocina gluconacina sobre microrganismos fitopatogênicos e benéficos às culturas de cana-de-açúcar e tomate, assim como o mecanismo de ação responsável pela inibição do crescimento dos mesmos, além de elucidar características físico-químicas desse peptídeo antimicrobiano. Essas informações são de grande relevância e abrem perspectivas promissoras ao desenvolvimento de um bioproduto de escala comercial.

8 REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KLAENHAMMER, T. R.; LETELLIER, L. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1006-1013, 1994.
- AGRIOS, G. N. Introduction to plant pathology. **Elsevier Academic Press Publication**, 2005.
- AHMAD, V. et al. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2017.
- ALI, B.; SABRI, A. N.; HASNAIN, S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1379-1384, 2010.
- ALMEIDA, I.M.G. Doenças causadas por bactérias. **Cana-de-açúcar**. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, p 882p., 2008.
- ALMEIDA, I.M.G. Bacterial diseases of sugarcane in Brazil. In: RAO, G.P. et al. (Eds.). **Current trends in sugarcane pathology**. Delhi: International Books & Periodicals Supply Service, p.73-84, 1994.
- AMES, B. N. [10] Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 115-118, 1966.
- ARENCIBIA, A. D. et al. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant signaling & behavior**, v. 1, n. 5, p. 265-273, 2006.
- ARNAU, J. et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein expression and purification**, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2006.
- BAE, J. Y. et al. Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. **Journal Microbiol Biotechnology**, v. 22, p. 1613-1620, 2012.
- BAI, Y.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D. L. An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promoting activity under greenhouse conditions. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 373, p. 1495-1502, 2002.
- BAI, Y.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop science**, v. 43, n. 5, p. 1774-1781, 2003.
- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina-II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.

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.

BANSAL, R. K. et al. Management of *Meloidogyne incognita* in cotton, using strains of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Nematologia Mediterranea**, v. 33, n. 1, 2005.

BASHIRI, S.; VIKSTRÖM, D.; ISMAIL, N. Optimization of protein expression in *Escherichia coli*. **BioPharm International**, v. 28, n. 5, 2015.

BASTIÁN, F. et al. 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, n. 1, p. 7-11, 1998.

BEHLAU, F. et al. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *xanthomonads*. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 409-418, 2013.

BELCHIOR, D. C. V. et al. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 34, n. 1, p. 135-151, 2017.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.

BERIĆ, T. et al. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 25-31, 2012.

BERTALAN, M. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 450, 2009.

BENITEZ, L. B. et al. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 791-797, 2010.

BEZERRA, M. **Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento de solutos osmoprotetores em arroz vermelho sob deficiência hídrica**. Monografia. Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba, 2014, 33p.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, Dhruva K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8 A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 512-519, 2002.

BLANCARD, D. **Tomato diseases: identification, biology and control: A Colour Handbook**. CRC Press, 2012.

BLANCO, Y. et al. 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, n. 4, p. 366-371, 2005.

BLANCO, Y.; LEGAZ, M.; VICENTE, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endophyte, inhibits xanthan production by sugarcane-invading *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Plant Interactions**, v. 5, n. 4, p. 241-248, 2010.

BLOCK, H. et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2009. p. 439-473.

BRESOLIN, I. T. L. et al. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, 2009.

BURGESS, R. R. [12] Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1996. p. 145-149.

BURGESS, R. R. Refolding solubilized inclusion body proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2009. p. 259-282.

BUTTNER, C. et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 34, 2017.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 3008-3013, 1995.

CARVALHO, K. G. et al. Characterization of multiple antilisterial peptides produced by sakacin P-producing *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. **Archives of microbiology**, p. 1-10, 2018.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988.

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 49, p. 313-334, 2001.

CHAMPOISEAU, P.; ROTT, P.; DAUGROIS, J.-H. Epiphytic populations of *Xanthomonas albilineans* and subsequent sugarcane stalk infection are linked to rainfall in Guadeloupe. **Plant disease**, v. 93, n. 4, p. 339-346, 2009.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

CHEN, H. et al. Cloning, expression, and identification of a novel class IIa bacteriocin in the *Escherichia coli* cell-free protein expression system. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 2, p. 359-364, 2012.

CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; NG, T. B.. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1411-1420, 2012.

CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current opinion in biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.

CHISNALL, B. et al. Insoluble protein purification with sarkosyl: facts and precautions. In: **Structural Genomics**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 179-186.

CHOWDHURY, S. P. et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 780, 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>.

COOKSEY, D. A.; MOORE, L. W. Biological Control of Crown Gall With an Agrocin Mutant of *Agrobacterium radiobacter*. **Phytopathology**, v. 72, n. 7, p. 919-921, 1982.

DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M. et al. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological research**, 2018.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-IN3, 1971.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010. p.349-404.

DRECHSEL, M. M. **Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênicas de cana-de-açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**. Tese. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro., 2011.

DU, H. et al. Purification, Characterization, and Mode of Action of Plantaricin GZ1-27, a Novel Bacteriocin against *Bacillus cereus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 18, p. 4716-4724, 2018.

DUPUY, B. et al. Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel σ factor. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1196-1206, 2005.

DURAIRAJ, K. et al. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. **Biological Control**, 2018.

ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; BAE, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. **Biological Control**, v. 103, p. 62-68, 2016.

ESKIN, N.; VESSEY, K.; TIAN, L. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. **International journal of agronomy**, v. 2014, 2014.

ETO, S. F. **Produção de anticorpos IGY anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* uso terapêutico e profilático em *Rachycentron canadum***. Tese. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. 2015, 84p.

FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 15/05/2018.

FARHANGNIA, L. et al. Cloning, expression, and purification of recombinant Lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 7, n. 5, 2014.

FEGAN, M.; PRIOR, P. **How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex**. APS press, 2005.

FERNANDEZ, M. et al. Effect of a *Pseudomonas fluorescens tailocin* against phytopathogenic *Xanthomonas* observed by atomic force microscopy. **Journal of biotechnology**, v. 256, p. 13-20, 2017.

FIELD, D. et al. Bacteriocin biosynthesis, structure, and function. **Research and Applications in Bacteriocins**, p. 5-43, 2007.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ª ed. Revista e ampliada. Viçosa, MG. UFV. 421p. 2008.

FILGUEIRAS, L. M. B. **Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento da tolerância de arroz vermelho à deficiência hídrica durante a fase reprodutiva**. Dissertação. Campina Grade: Universidade Estadual da Paraíba, 125f . 2015.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186, 2012.

FLOOD, J.. The importance of plant health to food security. **Food Security**, v. 2, n. 3, p. 215-231, 2010.

FONTANA, P. D. et al. Isolation and genetic characterization of *Acidovorax avenae* from red stripe infected sugarcane in Northwestern Argentina. **European journal of plant pathology**, v. 137, n. 3, p. 525-534, 2013.

FONTOURA, R. et al. Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 205, 2009.

FUENTES-RAMIREZ, L.E et al. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, n. 2, p. 145-150, 1993.

GE, HEALTHCARE.Recombinant Protein Purification Principles and Methods, GE Healthcare Bio-Science AB, Sweden, 2012

GE, J. et al. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin synthesized by *Lactobacillus paracasei* HD1-7 isolated from Chinese sauerkraut juice. **Scientific reports**, v. 6, p. 19366, 2016.

GHEQUIRE, M. G.K. et al. A natural chimeric *Pseudomonas* bacteriocin with novel pore-forming activity parasitizes the ferrichrome transporter. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e01961-16, 2017.

GIGLIOTI, E.A.; M., S. False red stripe. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J. **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: Cirad Publications Service, 2000. p.27-31

GILLIS, M. et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 39, n. 3, p. 361-364, 1989.

GONG, H. S.; MENG, X. C.; WANG, H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. **Food control**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 2010.

GOPAL, J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The protein journal**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013.

GOTO, M. **Fundamental of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic, 1992, 342p.

GRÄSLUND, S. et al. Protein production and purification. **Nature methods**, v. 5, n. 2, p. 135, 2008.

GRAY, E. J. et al. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by PGPR strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. **Journal Applied Microbiology**, v. 100, p. 545-554, 2006.

GRINTER, R.; MILNER, J.; WALKER, D. Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria.**Biochemical Society Transactions**. V. 40, p.1498 1501, 2012.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089-1098, 2016.

GURURANI, M. A. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 245-258, 2013.

HAGEL, L.; JAGSCHIES, G.; SOFER, G.. **Handbook of process chromatography**. The Netherlands: Academic Press, 2008.

HAMMAMI, I.; TRIKI, M. A.; REBAI, A. Purification and characterization of the novel bacteriocin BAC IH7 with antifungal and antibacterial properties. **Journal of Plant Pathology**, p. 443-454, 2011.

HANSEN, S. K. et al. A label-free methodology for selective protein quantification by means of absorption measurements. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 11, p. 2661-2669, 2011.

HAO-XIN, L. V. et al. Screen and Preliminary Identification of Lactic acid bacteria to Produce Broad-Spectrum Bacteriocin. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, v. 12, p. 115, 2013.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.

HAYWARD AC. The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*, ed. JG Swings, EL Civerolo, pp. 1–119. London, United Kingdom: Chapman & Hall, 1993.

HEATLEY, N. G. A method for the assay of penicillin. **Biochemical Journal**, v. 38, n. 1, p. 61, 1944.

HIRANO, S. S.; UPPER, Christen D. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* - a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 624-653, 2000.

HOUSSEIN, A. A.; AHMED, S. M.; ISMAIL, A. A. Activation of tomato plant defense response against *Fusarium* wilt disease using *Trichoderma harzianum* and salicylic acid under greenhouse conditions. **Research Journal Agriculture Biological Science**, v. 6, n. 3, p. 328-338, 2010.

HUANG, C. et al. Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 221-227, 2012.

IBGE. Estatística da produção agrícola. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>. Acesso em: 05/09/18

JABEEN, N. et al. Bio-physicochemical characterization and applied studies of Carotovoricin na5 (crna5) on blb affected rice plants. **Pakistan Journal Botany**, v. 46, n. 6, p. 2249-2256, 2014.

JACQUES, M. et al. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. **Annual review of phytopathology**, v. 54, p. 163-187, 2016.

- JIMENEZ-SALGADO T., et al. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology** 63:3676–3683, 1997
- JIANG, H.; LI, P.; GU, Q. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against salmonella spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. **Protein expression and purification**, v. 127, p. 28-34, 2016.
- JIANG, H. et al. Plantaricin NC8 from *Lactobacillus plantarum* causes cell membrane disruption to *Micrococcus luteus* without targeting lipid II. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-9, 2018.
- KAMENŠEK, S. et al. Genes regulated by the *Escherichia coli* SOS repressor LexA exhibit heterogenous expression. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 283, 2010.
- KAMILOVA, F. et al. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1809-1817, 2005.
- KANG, T.; KIM, W. Characterization of an amylase-sensitive bacteriocin DF01 produced by *Lactobacillus brevis* DF01 isolated from dongchimi, Korean fermented vegetable. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 30, n. 5, p. 795-803, 2010.
- KAYALVIZHI, N.; RAMESHKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P. Cloning and characterization of mersacidin like bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3 in *Escherichia coli*. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 5, p. 2298-2306, 2016.
- KÉKESY D. A.; PIGUET. J. D. New method for detecting bacteriocin production. **Applied Microbiology** , v. 20, p.282-283, 1970.
- KELMAN, A.; JENSEN, J. H. Maintaining virulence in isolates of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 41, n. 2, p. 185-187, 1951.
- KELMAN, A.; SEQUEIRA, L. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 55, p. 304-309, 1965.
- KRAM, K. E.; FINKEL, S. E. Rich Media Composition Affects Survival, Glycation, and Mutation Frequency of *Escherichia coli* During Long-Term Batch Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM. 00722-15, 2015.
- KRAUSE, M. et al. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 11, 2010.
- KUDOU, M. et al. Refolding single-chain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. **Protein expression and purification**, v. 77, n. 1, p. 68-74, 2011.

KYEREMEH, A.G., T. et al. Biological control of soft rot of Chinese Cabbage using single and mixed treatments of bacteriocin-producing avirulent mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **J. Gen. Plant Pathology.**, 66(3): 264-268, 2000.

LAEMMLI, U. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. **Nature**, v. 227, p. 680-686, 1970.

LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R. da S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1381-1387, 2010.

LANDELL, M.G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão Agrícola**, v. 1, n. 1, p. 18-23, 2004.

LECLÈRE, V. et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organisms antagonistic and biocontrol activities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4577-4584, 2005.

LIAO, H. et al. Analysis of *Escherichia coli* cell damage induced by HPCD using microscopies and fluorescent staining. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 169-176, 2010.

LIU, G. et al. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians' intestine. **Food control**, v. 50, p. 889-895, 2015.

LOGANATHAN P., et al. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. **Journal Applied Microbiology** v.87:167–172, 1999.

LOGESHWARN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatas*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Vol. 44, No. 3, February 2011, 216–223

LOPES, C. A. Murcha bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. **Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 1994.

LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2013.

LOPES, C.A; QUEZADO-DUVAL, M.A. Doenças bacterianas. In: LOPES CA; ÁVILA AC (ed). **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa-CNPH/Embrapa Hortaliças. p. 62-64, 2005.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças causadas por bactérias em tomate. **Controle de doenças de plantas: hortaliças**, 2000.

LÓPEZ-CUELLAR, M. R.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N. LAB bacteriocin applications in the last decade. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 6, p. 1039-1050, 2016.

MADHAIYAN, M. et al. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiological research**, v. 159, n. 3, p. 233-243, 2004.

MAKSIMOV, I. V.; ABIZGIL'DINA, R. R.; PUSENKOVA, L. I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 333-345, 2011.

MALHOTRA, A. "Tagging for protein expression," **Methods in Enzymology**, vol. 463, pp. 239–258, 2009.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O. et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293-319, 2010.

MATSUOKA, S. Identificação de Doenças da Cana-de-Açúcar e Medidas de Controle. SANTOS, F.; BORÉM, A. **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**, p. 89-115, 2013

MATSUOKA, S.; MACCHERONI, W. Manejo de doenças. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e etanol – Tecnologias e Perspectivas**. Ed. UFV. 2012

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 285-308, 2001.

MILOJEVIC, T. et al. False positive RNA binding activities after Ni-affinity purification from *Escherichia coli*. **RNA biology**, v.10, 2013.

MONTVILLE, T. J.; BRUNO, M. E. C. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. **International journal of food microbiology**, v. 24, n. 1-2, p. 53-74, 1994.

MOULOUD, G. et al. New bacteriocin from *Bacillus clausii* strain GM17: purification, characterization, and biological activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 2186-2200, 2013.

MOUSSA, M.; PERRIER-CORNET, J; GERVAIS, P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6508-6518, 2007.

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, n. 1, p. 57-66, 2005.

MOZAMBANI, A. E. et al. História e morfologia da cana-de-açúcar. **Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba**, v. 1, n. 11-18, 2006.

MURTHY, K, N. et al. Characterization of bacteriocin from lactic acid bacteria and its antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* causing tomato wilt. **Plant Science Archives**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 2016.

MUTHUKUMARASAMY, R. et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, p. 137-145, 2002.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, v. 78, n. 9, p. 1063-1065, 2000.

NAIR, A. et al. Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternata*. **Plant Biology**, v. 17, n. 3, p. 625-631, 2015.

NAKANO, M. M.; ZHENG, G.; ZUBER, P. Dual control of sbo-alb operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 11, p. 3274-3277, 2000.

NARASIMHA MURTHY, K. et al. Characterization of bacteriocin from lactic acid bacteria and its antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* causing tomato wilt. **Plant Science Archives**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 2016.

NASHWA, S. M. A et al. Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. **Plant Protection Science**, v. 48, n. 2, p. 74-79, 2012.

NAZ, S. A. et al. Biophysicochemical characterization of Pyocin SA189 produced by *Pseudomonas aeruginosa* SA189. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1147-1154, 2015.

NEERAJA, C. et al. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 231-241, 2010.

NIETO-PEÑALVER, C. G. et al. Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 549-558, 2014.

OERKE E-C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science** 144: 31–43, 2006.

OKUDA, K. et al. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 00888-13, 2013.

OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, T. F. et al. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2009.

OLIVEIRA, M. M. **Atividade antimicrobiana da bacteriocina tipo Linocina M18 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 contra *Xanthomonas albilineans***. Dissertação. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 73 f., 2013.

OLIVEIRA, M. M. et al. Gluconacin from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria. **Journal of applied microbiology**, 2018.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

OVERTON, T. W. et al. Microarray analysis of gene regulation by oxygen, nitrate, nitrite, FNR, NarL and NarP during anaerobic growth of *Escherichia coli*: new insights into microbial physiology. 2006.

PAL, G.; SRIVASTAVA, S. Scaling up the production of recombinant antimicrobial plantaricin E from a heterologous host, *Escherichia coli*. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 7, n. 3, p. 216-221, 2015.

PARET, M. L. et al. Photocatalysis: effect of light-activated nanoscale formulations of TiO₂ on *Xanthomonas perforans* and control of bacterial spot of tomato. **Phytopathology**, v. 103, n. 3, p. 228-236, 2013.

PATIL N. B et al. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. **International Journal Environmental Science**.;2:295-302, 2011.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). **Genetic improvement of solanaceous crops**, v. 2, p. 1-27, 2007.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 763-770, 2004.

PIÑÓN, D et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 345-351, 2002.

PINSACH, J. et al. Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 7, p. 507-512, 2008.

POKUSAEVA, K. et al. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. **Open Life Sciences**, v. 4, n. 2, p. 196-203, 2009.

POTNIS, N. et al. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015.

PRÍNCIPE, A. et al. Effectiveness of tailocins produced by *Pseudomonas fluorescens* SF4c in controlling the bacterial-spot disease in tomatoes caused by *Xanthomonas vesicatoria*. **Microbiological research**, v. 212, p. 94-102, 2018.

PRUDENT, M. et al. Soybean is less impacted by water stress using *Bradyrhizobium japonicum* and thuricin-17 from *Bacillus thuringiensis*. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 749-757, 2015.

PYE, M. F. et al. Induced resistance in tomato by SAR activators during predisposing salinity stress. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 116, 2013.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2010.

REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RICHARD, Christelle et al. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 13, p. 4276-4284, 2004.

ROCHA, F. Y. O. et al. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied soil ecology**, v. 120, p. 8-19, 2017.

ROJAS, M. M. et al. Relationships between nitrogen fixation and auxins production in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains from different crops. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 11, n. 1, p. 84-93, 2009.

SACHDEV, D. et al. Assessment of microbial biota associated with rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) during flowering stage and their plant growth promoting traits. **International Journal Microbiology**, v. 10, 2008.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sci Med Res**, v. 21, n. 1, p. 30, 2011.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 307, n. 1-2, p. 249-264, 2008.

SALLES, J. F. et al. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the cry3A gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 154-160, 2000.

SALMON, K. et al. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: the effects of oxygen availability and FNR. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.

SANGUINO, A. As principais doenças da cana-de-açúcar. In: **Curso à Distância Tópicos Da Cultura de Cana-De-Açúcar**. Instituto Agrônômico, 2012.

SASHIHARA, T. et al. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2420-2428, 2000.

SAUMTALLY, A. S.; DOOKUN-SAUMTALLY. In: RAO, G. P. **Sugarcane Pathology, Vol. 3: Bacterial and Nematode Diseases**. CRC Press, 2004.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. de. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. de A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2010.882p.

SEGATO, S.V.; PINTO, A. de S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. de. **Atualização em produção em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 2006. 415p

SHEHANE, S. D.; SIZEMORE, R. K. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 2, p. 322-328, 2002.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SINGHA, T. K. et al. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 17-31, 2017.

SIVASHANMUGAM, A. et al. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Science**, v. 18, n. 5, p. 936-948, 2009.

SOARES, L. H. B. et al. Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil. **Embrapa Agrobiologia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2009.

SOUZA, L. T. et al. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, 2010.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 43, p. 83-116, 2005.

SUBASHINI, M. et al. Recombinant *Gluconacetobacter diazotrophicus* containing cry1Ac gene codes for 130-kDa toxin protein. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 236-242, 2011.

SUBRAMANIAN, S. Mass spectrometry based proteome profiling to understand the effects of lipo-chito-oligosaccharide and thuricin 17 in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max* under salt stress. **McGill University, Montreal**, 2013.

SUBRAMANIAN, S.; SMITH, Donald L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome—from an agriculture perspective. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 909, 2015.

SUGAYAMA, R. L. et al. (Ed.). **Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas**. SBDA, Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, 2015.

SURESH et al. **Tomato disease – Field Guide**. Ed. Seminis Vegetable Seeds, 2017.

TANG, X. et al. Antimicrobial activity and preliminary mode of action of PlnEF expressed in *Escherichia coli* against *Staphylococci*. **Protein expression and purification**, v. 143, p. 28-33, 2018.

TAO, H. et al. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. **Biotechniques**, v. 48, n. 1, p. 61-64, 2010.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A. et al. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, v. 39, n. 1, p. 49-55, 2000.

TONTOU, R. et al. Isolation of bacterial endophytes from *Actinidia chinensis* and preliminary studies on their possible use as antagonists against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **Journal of Berry Research**, v. 6, n. 4, p. 395-406, 2016.

TYEDMERS, J.; MOGK, A.; BUKAU, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 11, p. 777, 2010.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion–protein binding. **Journal of chromatography A**, v. 988, n. 1, p. 1-23, 2003.

UKKONEN, K. **Improvement of recombinant protein production in shaken cultures**. Dissertation, University of Oulu. 2014

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and 15 N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 5-21, 2012.

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

- VALIDOV, S. et al. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 461-471, 2007.
- VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In: **New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 243-254.
- VARGAS, L. et al. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114744, 2014.
- VASALA, A. et al. A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 8, 2006.
- VAUGHAN, A.; EIJSINK, V. GH; VAN SINDEREN, Douwe. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7194-7203, 2003.
- VIDEIRA, S. S.; CRUZ, G. B. da; BALDANI, V. L. D. **Gota d'água: método rápido para visualização de flagelos em bactérias**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 2 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 62).
- VIGNOLO, G. M. et al. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 1, p. 5-10, 1995.
- WINKOWSKI, K.; BRUNO, M. E.; MONTVILLE, Thomas J. Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4186-4188, 1994.
- WINSTEAD, N. N. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 42, p. 623-634, 1952.
- WONG, Jon W.; ALBRIGHT, R. L.; WANG, N. L. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications. **Separation and Purification Methods**, v. 20, n. 1, p. 49-106, 1991.
- YI, L. et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang, China. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 9, p. 7002-7015, 2016.
- YI, L.; LUO, L.; L., X. Heterologous expression of two novel bacteriocins produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 and application of BM1157 in control of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 86, p. 374-382, 2018.
- YIM, W. J. et al. Real time expression of ACC oxidase and PR-protein genes mediated by *Methylobacterium* spp. in tomato plants challenged with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 12, p. 1064-1075, 2014.

YONEYAMA, F. et al. Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3211-3217, 2009.

ZHAO, S. et al. Purification and characterization of plantaricin JLA-9: a novel bacteriocin against *Bacillus* spp. produced by *Lactobacillus plantarum* JLA-9 from Suan-Tsai, a traditional Chinese fermented cabbage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 13, p. 2754-2764, 2016.

ZHU, H. et al. Inhibition of *Ralstonia solanacearum* by AM fungus *Glomus versiforme* and their effect on phenols in root. **Wei sheng wu xue tong bao**, v. 31, n. 1, p. 1-5, 2004.