



**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul**

**Centro de Biotecnologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE BACTERIOCINAS  
PRODUZIDAS POR DIFERENTES LINHAGENS DE *Bacillus*  
ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA**

**Renata Voltolini Velho**

**Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli**

**Porto Alegre, setembro de 2010.**

**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul**

**Centro de Biotecnologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE BACTERIOCINAS  
PRODUZIDAS POR DIFERENTES LINHAGENS DE *Bacillus*  
ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA**

**Renata Voltolini Velho**

**Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Porto Alegre, setembro de 2010.**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. O projeto foi financiado pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo dom da vida!

Ao professor Dr. Adriano Brandelli por ter me aceitado como sua orientada, pela confiança e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Luis Fernando Costa Medina pelos ensinamentos científicos e outros, nem tão científicos assim.

Aos colegas de laboratório Ana, Daniel, Voltaire, Fê Lopes, Fer Leães, Stela, Karla, Lisi, Lucas, Pati, Eve e Simone, que comigo compartilharam experiências, vivências, conquistas, decepções, artigos e as minhas loucuras durante estes dois anos de convívio.

Às ICs Deise, Julise, Michele, Juliana e Virgínia pelo apoio e suporte constante.

A minha “querida, enorme e estabanada” Iniciação Científica, Ana Paula Basso, pela colaboração e oportunidade em ajudá-la.

À professora Siu Mui Tsai pela possibilidade de parceria e pela maravilhosa recepção em Piracicaba.

À Danielle Caldas pela paciência, atenção e disponibilidade em ajudar-me.

Ao meu irmão Vinícius, que mesmo sem entender sobre PCR, DNA, incentivou-me desde o princípio, e principalmente quando tudo parecia dar errado.

À minha mãe, pelas palavras diárias de incentivo e pela presença constante mesmo tão longe.

Ao meu padrasto Joel, pelo apoio, incentivo e carinho, além é claro, da certeza de que tudo daria certo.

As minhas amigas, Déia Faccini, Gabi Martins e Angélica Rissi, confidentes, psicólogas de plantão, pelo suporte psicológico e físico.

A todos, que de alguma forma, fizeram a diferença nesta conquista.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>10</b>
2.1	Bacteriocinas	10
2.2	Classificação	12
2.3	Aplicações	14
2.4	Bacteriocinas produzidas por espécies de <i>Bacillus</i>	17
2.4.1	Subtilina	18
2.4.2	Subtilosina A	20
2.4.3	Surfactina	23
2.4.4	Iturina A	26
2.5	Bacteriocinas produzidas por linhagens bacterianas isoladas de diferentes ambientes	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>4</b>	<b>CAPÍTULOS</b>	<b>32</b>
4.1	<b>CAPÍTULO I</b> Production of lipopeptides among <i>Bacillus</i> strains showing remarkable inhibition of phytopathogenic fungi	32
4.2	<b>CAPÍTULO II</b> Presence of genes related to be production of subtilosin A and subtilin among <i>Bacillus</i> strains from the Amazon basin	53
4.3	<b>CAPÍTULO III</b> Real time PCR investigation on the expression of <i>sboA</i> and <i>ituD</i> genes in <i>Bacillus</i> spp.	65
4.4	<b>CAPÍTULO IV</b> Análise dos dados de qRT-PCR	85
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>96</b>
6.1	CONCLUSÃO GERAL	96
6.2	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	96
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μL</b>	Microlitros
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	Infusão de Cérebro e Coração
<b>BLS</b>	Substância tipo-bacteriocina
<b>Da</b>	Daltons
<b>EDTA</b>	Etilenodiaminotetracético
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GRAS</b>	<i>Generally regarded as safe</i>
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	kiloDaltons
<b>MALDI-TOF</b>	Espectrometria de Massas MALDI-TOF
<b>mg</b>	Miligramas
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDA</b>	Ágar batata
<b>qRT-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RSM</b>	Metodologia de Superfície de Resposta
<b>s</b>	Segundos
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>Tris</b>	Hidroximetilaminometano
<b>TSA</b>	Ágar triptona de soja
<b>TSB</b>	Caldo triptona de soja

## RESUMO

Bacteriocinas são peptídeos com atividade bactericida ou bacteriostática para espécies sensíveis ao produto bacteriano. Estas substâncias são compostos heterogêneos em relação à massa molecular, propriedades bioquímicas, espectro inibitório e mecanismos de ação. Apesar dos trabalhos realizados quanto à biodiversidade da Amazônia, poucos estudos são desenvolvidos com o objetivo de investigar a complexidade genética e o potencial biotecnológico desta região, principalmente quando se trata de micro-organismos. Neste âmbito, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de genes de bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens de *Bacillus* isoladas de intestino de peixes da Região Amazônica, Brasil. Os PCRs mostraram que as cinco linhagens testadas apresentam o gene funcional codificante de malonil Coa transacilase (*ituD*), para o gene codificador da pré-subtilosina A (*sboA*) e para o gene codificador da pré-subtilina (*spaS*). Quatro isolados possuem também o suposto gene terminador transcricional (*sfp*). A inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos caracterizou a atividade antimicótica dos isolados. A caracterização da atividade biosurfactante foi realizada pela presença de zonas de hemólise ao redor de cada colônia e atividade emulsificante. Análises realizadas por MALDI-TOF confirmam a produção de surfactina, iturina A, subtilina, subtilosina A e isoformas. Ao comparar as linhagens de *Bacillus* Amazônicas com *Bacillus subtilis* ATCC 19659 em relação ao nível de expressão de *sboA* e *ituD*, observou-se, de forma geral, um nível de expressão de *sboA* pelos isolados Amazônicos inferior a *B. subtilis* ATCC 19659. Em contraste, quando os níveis de *ituD* foram avaliados, percebeu-se que as linhagens Amazônicas exibiram altos níveis de expressão deste gene. Acredita-se que independente do controle regulatório a que estão subordinados os operons de iturina A e subtilosina A nas condições de estresse utilizadas por este estudo, os isolados de *Bacillus* possuem um nível basal de expressão diferenciado entre si e em relação à *B. subtilis* ATCC 19659.

## ABSTRACT

Bacteriocins are peptides with bactericidal or bacteriostatic activity for species closely related to bacterial product. These substances are heterogeneous compounds in relation to molecular weight, biochemical properties, inhibitory spectrum and mechanisms of action. Despite the work done on the biodiversity of the Amazon, few studies were developed with the objective of investigating the genetic complexity and biotechnology potential in this region, especially when it comes to microorganisms. In this context, this study aimed to verify the presence of genes of bacteriocins produced by five strains of *Bacillus* isolated from aquatic environment of the Amazon region, Brazil. The PCRs showed that strains tested exhibit potential for the functional gene encoding for malonyl CoA transacylase (*ituD*), for the gene encoding prosubtilisin A (*sboA*), and the gene encoding prosubtilin (*spaS*). Four isolates also have potential for the putative transcriptional terminator gene (*sfp*). Inhibiting the growth of pathogenic fungi characterizes the antimycotic activity of the isolates. The characterization of biosurfactant activity is undertaken by the presence of zones of hemolysis around each colony, as well the emulsifying activity. Analyses carried out by MALDI-TOF mass spectrometry confirmed the production of surfactin, iturin A subtilin, subtilisin A and isoforms. By comparing *Bacillus* strains isolated from the Amazon region with *Bacillus subtilis* ATCC 19659 on the level of *sboA* and *ituD* expression, there was, overall, a level of *sboA* expression of the isolated Amazonian less than *B. subtilis* ATCC 19659. In contrast, when levels of *ituD* were evaluated, it was noticed that the Amazonian strains exhibited high levels of expression of this gene. It is believed that regardless of regulatory control that are the subject of iturin A and subtilisin A operons in stress conditions used in this study, isolates of *Bacillus* have a baseline level of expression is different among themselves and in relation to *B. subtilis* ATCC 19659.



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, novos desafios têm-se apresentado para as indústrias farmacêuticas e de alimentos no que se refere ao combate a micro-organismos patogênicos e deteriorantes. O crescente impacto da resistência de bactérias e fungos a medicamentos e conservantes tem levado as indústrias a buscar novas substâncias que inibam o crescimento dos micro-organismos resistentes.

A resistência a antimicrobianos é um exemplo clássico de evolução em resposta a uma forte pressão de seleção. Esforços vêm sendo realizados em diferentes países buscando estudar e contornar este problema. Entre as soluções propostas estão o uso racional de drogas antimicrobianas e a descoberta de novos antimicrobianos.

Paralelamente a estes fatos, há um crescente interesse por métodos de bioconservação de alimentos com o objetivo de reduzir o uso de aditivos químicos nestes produtos. Estudos indicam o potencial de antagonismo de alguns micro-organismos assim como de seus metabólitos antimicrobianos, permitindo elaborar alimentos sem conservantes químicos.

Dessa forma, as bacteriocinas demonstram ser uma estratégia promissora no campo biotecnológico, tendo em vista uma potencial aplicação prática e um grande número destas já terem sido identificadas e caracterizadas. Isto pois possibilitará o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de substâncias antimicrobianas eficazes, naturais e/ou sintéticas, capazes de eliminar o patógeno.

Bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza protéica, sintetizadas por várias espécies de bactérias. Esta classe de substâncias pode apresentar diversas características: estabilidade ao calor, estabilidade ao baixo pH, baixa toxicidade, refrigeração e congelamento; aparecendo como um agente potencial a ser aplicado em sistemas de conservação de alimentos de modo a promover alimentos mais estáveis do ponto de vista microbiológico.

Cerca de 700 peptídeos antimicrobianos já foram identificados não só em bactérias, mas também em fungos, insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, plantas, aves, anfíbios, peixes e mamíferos. Em geral, são moléculas pequenas de até 5 kDa que exibem um alto teor de aminoácidos básicos e pelo menos 50% de aminoácidos hidrofóbicos, sendo compostos promissores para o desenvolvimento de pesquisas por novas substâncias antimicrobianas, buscando sua adequada aplicação.

A biodiversidade microbiana da Amazônia bem como seu potencial biotecnológico não tem sido plenamente estudada. Poucos trabalhos mostram produtos do metabolismo microbiano com potencial uso em indústrias e mostram menos ainda antimicrobianos produzidos por isolados bacterianos desta região. Neste contexto, a pesquisa, purificação e caracterização química, biológica e genética dessas substâncias antimicrobianas provenientes da biodiversidade brasileira são valiosíssimas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um amplo espectro de substâncias eficientes na atuação contra micro-organismos patógenos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos com atividade bactericida ou bacteriostática contra outros micro-organismos, ou da mesma espécie (espectro estreito), ou de diferentes gêneros (amplo espectro). Estas substâncias são compostos heterogêneos em relação à massa molecular, propriedades bioquímicas, espectro inibitório e mecanismos de ação (COTTER *et al.*, 2005; SWE *et al.*, 2007).

Genes envolvidos na biossíntese destas substâncias são organizados tipicamente em operons que incluem o gene estrutural da bacteriocina e genes cujos produtos atuam na maturação, exportação, imunidade, e, em alguns casos, na regulação da expressão do próprio operon (ZHENG *et al.*, 1999; COTTER *et al.*, 2005). A determinação genética de muitas dessas moléculas já foi realizada, sendo que algumas estão relacionadas a plasmídeos, outras ao cromossomo e outras ainda, a transposons (MCAULIFFE *et al.*, 2001; DEEGAN *et al.*, 2006). Estes pequenos genes codificam polipeptídeos primeiramente como precursores que, posteriormente sofrem modificações químicas durante sua maturação. Possuem porção N-terminal hidrofílica que atua no processo de secreção e são subsequentemente removidos proteoliticamente, originando as bacteriocinas ativas (JACK *et al.*, 1995; COTTER *et al.*, 2005). Em *Bacillus*, alguns

polipeptídeos antibióticos, como as bacteriocinas, são codificados por genes e sintetizados ribossomalmente, enquanto outros são produzidos não-ribossomalmente por um mecanismo multienzimático (ZUBER *et al.*, 1993; RILEY & WERTZ, 2002). A produção de bacteriocinas é induzida geralmente por uma combinação de alta densidade celular e da baixa disponibilidade de nutrientes (KLEEREBEZEM *et al.*, 1997; LEROY & DE VUYST, 2001; ZAMFIR & GROSU-TUDOR, 2009).

O uso das bactérias como agentes de biocontrole tem sido estudado extensivamente (TOURÉ *et al.*, 2004; PARRET *et al.*, 2005; LEVERENTZ *et al.*, 2006; HAMMAMI *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2010). Devido a seu uso potencial como preservativos naturais, as bacteriocinas produzidas por bactérias produtoras de ácido láctico durante a fermentação do leite tornaram-se foco de uma intensa investigação nos últimos anos (EIJISINK *et al.*, 1998; URSO *et al.*, 2006; GALVÉZ *et al.*, 2007), e muitas tentativas estão sendo feitas para a incorporação destas nos processos e nos produtos (O'SULLIVAN *et al.*, 2002; CASTELLANO *et al.*, 2008; SOBRINO-LÓPEZ & MARTÍN-BELLOSO, 2008; RANDAZZO *et al.*, 2009). Diversas bacteriocinas ou substâncias tipo-bacteriocinas (BLS) produzidas pelo gênero *Bacillus* tem sido relatadas (ALTENA *et al.*, 2000; MARREC *et al.*, 2000; CHERIF *et al.*, 2001; ABRIOUEL *et al.*, 2002; GARCÍA *et al.*, 2003; CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004; BIZANI *et al.*, 2005; LISBOA *et al.*, 2006; SEBEI *et al.*, 2007; CHERIF *et al.*, 2008; HAMMAMI *et al.*, 2009).

## 2.2 Classificação das bacteriocinas

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas são ordenadas em quatro classes segundo a sua estrutura primária, estabilidade térmica, massa molecular e mecanismo de ação. Em geral, a Classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, são pequenos peptídeos que possuem de 19 a 38 aminoácidos (aproximadamente 3 kDa) e são caracterizados pela presença de aminoácidos não usuais como lantionina,  $\beta$ -metilantionina, dehidrobutirina e dihidroalanina. A Classe II, contém peptídeos pequenos (<10 kDa), não modificados e estáveis ao calor. São propostas três subclasses: a IIa, que inclui peptídeos como a pediocina, ativos contra *Listeria monocytogenes*, com a sequência N-terminal conservada Tyr-Gly-Asn-Gly-Val e dois resíduos de cisteína formando a ponte S-S, na metade N-terminal do peptídeo; a IIb, com bacteriocinas compostas de dois peptídeos diferentes, necessitando de ambos para ser totalmente ativa, como a lactocina G; e a IIc, representada pela lactocina B, proposta para separar as bacteriocinas secretadas pelo sistema sec-dependente. Já na Classe III, tem-se as bacteriocinas maiores (> 30 kDa) e lábeis ao calor como helveticina J. Na Classe IV, encontram-se bacteriocinas que formam complexos com outras macromoléculas (como carboidratos e lipídios), não sendo uma classe muito bem estudada bioquimicamente. Esta classe só foi considerada a partir do momento em que se observou que algumas atividades de bacteriocinas obtidas de sobrenadantes livres de células foram perdidas por tratamento não só com proteases, mas com enzimas lipolíticas e glicolíticas. No entanto, Cleveland *et al.* (2001) acreditam que estes

complexos são artefatos de purificação e não uma nova classe de bacteriocinas.

Em 2005, Cotter *et al.* propuseram uma nova classificação, subdividindo as bacteriocinas em duas classes distintas: os lantibióticos (classe I) contendo lantionina e os não lantibióticos (classe II), enquanto os peptídeos termolábeis de alta massa molecular, componentes da classe III, seriam designados “bacteriolisinas”.

Dridger *et al.*, em 2006, apresentaram uma classificação onde as bacteriocinas estariam distribuídas em três classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas. Os lantibióticos, pequenos peptídeos (< 3 kDa) termoestáveis que apresentam em sua constituição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina, formam a Classe I. Esta classe apresenta um duplo mecanismo de ação, interfere na síntese da parede celular e também promove a formação de poros na membrana celular, o que resulta na alteração da permeabilidade da mesma, com efluxo de íons  $K^+$ , aminoácidos e ATP, levando a morte celular (BREUKINK *et al.*, 1999). Na Classe II, têm-se peptídeos pequenos (< 10 kDa) termoestáveis que apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na membrana da célula alvo, promovendo sua despolarização e subsequentemente, a morte celular. Para esta Classe, Dridger *et al.* (2006) propõem três subdivisões: IIa, formada por bacteriocinas com alta especificidade contra *Listeria monocytogenes* (KAISER & MONTVILLE, 1996); IIb, composta por bacteriocinas heterodiméricas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos (GARNEAU *et al.*, 2002); e IIc, constituída por bacteriocinas que apresentam uma ligação covalente das terminações C e N,

resultando em uma estrutura cíclica (MAQUEDA *et al.*, 2008). A Classe III é composta por grandes proteínas (> 30 kDa) termolábeis. O mecanismo de ação desta classe de bacteriocinas se diferencia das demais, pois atua na lise da parede celular do micro-organismo alvo. Apresenta uma porção N-terminal homóloga a uma endopeptidase, responsável pela catálise da parede celular, e uma porção C-terminal responsável pelo reconhecimento da célula alvo (KLAENHAMMER, 1993; COTTER *et al.*, 2005).

### **2.3 Aplicações**

A indústria alimentícia tem voltado sua atenção para a obtenção de produtos seguros, de alta qualidade, sem adição de conservantes químicos e que possuam uma maior vida de prateleira. Além disso, a legislação para alimentos busca limitar a utilização de alguns aditivos em diversos produtos. Paralelamente, pesquisas sobre novos agentes antimicrobianos são desenvolvidas de modo que possam ser aplicadas nos sistemas de conservação alimentícia promovendo uma proteção contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes (SOUZA *et al.*, 2005; SUTYAK *et al.*, 2008; ARAUZ *et al.*, 2009).

Essa nova perspectiva de conservação de alimentos busca a aplicação de sistemas antimicrobianos naturais onde se enfatiza a ação sinérgica de vários elementos. Incluem produtos com atividade antimicrobiana oriunda de animais, plantas e micro-organismos, juntamente com procedimentos de natureza física, procedimentos de embalagem e estocagem

dos produtos. E a associação destas ações, produz um efeito capaz de criar condições desfavoráveis à sobrevivência dos micro-organismos indesejáveis (COTTER *et al.*, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006; TIWARI *et al.*, 2009).

Buscando novas tecnologias a serem aplicadas na conservação dos alimentos, o uso de substâncias produzidas por micro-organismo, em especial as bacteriocinas, têm despertado o interesse dos pesquisadores (DAW & FALKINER, 1996; DEEGAN *et al.*, 2006; TIWARI *et al.*, 2009). Porém, características como propriedades toxicológicas, potenciais efeitos cumulativos e sinergismos devem ser estudados antes de sua aplicação como bioconservantes (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Algumas bacteriocinas já possuem seu potencial de ação bem estabelecido como antimicrobiano, assim como sua possível aplicação como bioconservante de alimentos. A nisina foi a primeira bacteriocina a ser isolada e aprovada para o uso em alimentos, especificamente para prevenir a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* em queijos. Em 1988, seu uso foi aprovado para outros alimentos, sendo hoje um produto amplamente aplicado comercialmente (CHUNG *et al.*, 1989; SOUZA *et al.*, 2005; SOBRINO-LÓPEZ & MARTÍN-BELLOSO, 2008; ARAUZ *et al.*, 2009).

As bacteriocinas da Classe IIa recebem atenção especial de grupos de estudos e da indústria alimentícia devido a sua capacidade de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, um micro-organismo psicotrófico, capaz de multiplicar-se em temperatura de 4 a 45 °C, e de sobreviver por mais de um ano no leite, quando estocado a 5 °C. Surtos de listeriose em produtos processados indicam tecnicamente, tratamento inadequado ou contaminação



pós-processamento (ENNAHAR *et al.*, 2000; COTTER *et al.*, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006; DRIDER *et al.*, 2006).

Como alternativa ao rápido desenvolvimento de patógenos multi-resistentes, as bacteriocinas, novamente, despertam interesses como um novo método de terapia antimicrobiana. E tendo em vista a diversidade de bacteriocinas produzidas na natureza, a exploração do potencial de aplicação destas se faz necessário, para que se possa sugerir e aprovar o uso de novas substâncias contra patógenos humanos e importância veterinária (RILEY & WERTZ, 2002; SANG & BLECHA, 2008).

Em fitopatologia, certas estratégias de biocontrole ancoram-se na capacidade do antagonista ser produtor de uma bacteriocina à qual o patógeno alvo é sensível (DONG *et al.*, 2004; MONTESINOS, 2007; KONG *et al.*, 2010). Entre as bactérias produtoras de bacteriocinas com ação sobre fungos fitopatogênicos encontram-se membros dos gêneros *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Agrobacterium*. Estes compostos são altamente específicos, efetivos e seguros para os usuários e para o ambiente, e parecem ser uma excelente alternativa para o uso na agricultura (JABBEN *et al.*, 2004; MONTESINOS, 2007; KONG *et al.*, 2010).

Em termos de ecologia bacteriana, assume-se que as espécies produtoras de bacteriocinas possuem uma vantagem adicional sobre aquelas incapazes de sintetizá-las e que a elas são sensíveis. Considera-se isso uma "vantagem competitiva" quando micro-organismos, por serem taxonomicamente afins, possuem potencialidades bioquímicas e fisiológicas semelhantes para disputarem nichos ecológicos no ambiente em que vivem

(RILEY, 1998; RILEY & WERTZ, 2002; WEST *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2009).

#### **2.4 Bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus***

O gênero *Bacillus* inclui uma variedade de espécies importantes industrialmente e tem um histórico de uso tanto em alimentos quanto na indústria. Enzimas, antibióticos, aminoácidos e inseticidas fazem parte da gama de produtos produzidos por *Bacillus* e existentes no comércio hoje. A produção de bacteriocinas também tem sido descrita para este gênero, sendo a subtilina, subtilosina A, iturina A e surfactina apenas algumas destas substâncias (KLEIN *et al.*, 1993; MARREC *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2009).

As espécies de *Bacillus* têm como habitat natural o solo, mas apresentam-se amplamente distribuídas no ambiente. Podem ser isolados de vários habitats como plantas, mananciais de água, águas poluídas, sedimentos marinhos, alimentos, entre outros. Estes ambientes promovem condições ideais para o crescimento e proliferação das espécies assim como a manutenção da sua forma de resistência. A capacidade de distribuição e persistência dos esporos faz com que este gênero se mantenha latente nos mais diversos ambientes (GEBHARDT *et al.*, 2002; ORTEGA-MORALES *et al.*, 2009).

Este gênero constitui um grupo interessante para o estudo de novas substâncias com atividade antimicrobiana, tendo sido observada a produção de peptídeos antimicrobianos com estruturas químicas diferentes

(GEBHARDT *et al.*, 2002; SCHULZ *et al.*, 2009). Em comparação com os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas, o conhecimento ainda é limitado sobre bacteriocinas do gênero *Bacillus* (RILEY & WERTZ, 2002; MIZUMOTO *et al.*, 2006; DOMINGUEZ *et al.*, 2007; ANTHONY *et al.*, 2009; EL-SERSY *et al.*, 2010).

#### **2.4.1 Subtilina**

Subtilina é uma bacteriocina do tipo lantibiótico sintetizada por *Bacillus subtilis*. Lantibióticos possuem uma atividade antimicrobiana elevada contra diversas bactérias gram-positivas tais como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp. (SCHNELL *et al.*, 1988; COTTER *et al.*, 2005; CINQUEMANI *et al.*, 2007).

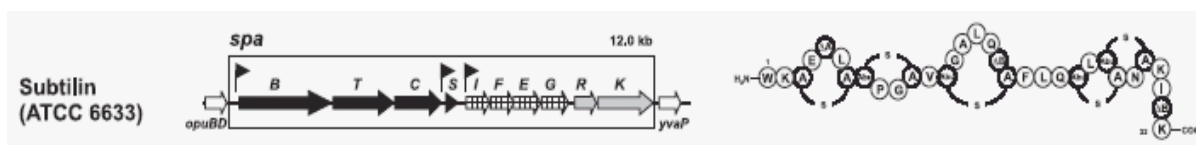
A subtilina é muito similar à nisina, que é a mais importante bacteriocina do grupo dos lantibióticos lineares e é usada como um conservante de alimentos (KLEIN & ENTIAN, 1994; CHATTERJEE *et al.*, 2005; ARAUZ *et al.*, 2009). Como descrito anteriormente para outros lantibióticos, a subtilina é sintetizada ribossomalmente como um pré-peptídeo inativo e modificado pós-transcricionalmente (SCHNELL *et al.*, 1989; CHATTERJEE *et al.*, 2005). O transcrito preliminar dos genes deste lantibiótico é um pré-peptídeo de 56 aminoácidos que consiste em uma sequência líder N-terminal seguido por um pré-peptídeo C-terminal que é a proteína ativa, com 32 aminoácidos. O peptídeo maduro contém aminoácidos modificados como

lantionina, dehidroalanina e dehidrobutirina (BANERJEE & HANSEN, 1988; STEIN, 2005).

A biossíntese desta bacteriocina é baseada na expressão de dez genes que estão organizados no *cluster* gênico *spaBTCSIFEGRK* (Fig. 1). O gene *spaS* codifica o pré-peptídeo da subtilina ao qual são introduzidos enzimaticamente aminoácidos modificados pelos produtos dos genes *spaB* e *spaC*. O precursor modificado é transportado através da membrana citoplasmática pelo transportador ABC codificado por *spaT*, que parece ser um complexo associado a membrana com enzimas modificadas SpaB e SpaC. As células são protegidas contra a atividade antimicrobiana pela produção de uma imunidade composta por Spal, SpaF e SpaG. Já os genes *spaR* e *spaK* são responsáveis por dois sistemas regulatórios da bacteriocina subtilina (KLEIN & ENTIAN, 1994; XIE *et al.*, 2002; WILLEY & VAN DER DONK, 2007; PARISOT *et al.*, 2008).

A expressão dos genes de imunidade e biossíntese da subtilina são reguladas por dois mecanismos diferentes. Durante a fase de crescimento exponencial, a proteína reguladora de estado de transição, AbrB, atua como um repressor da biossíntese da subtilina e somente um nível basal das proteínas SpaBTC são sintetizadas. Conseqüentemente, uma pequena quantidade de subtilina é produzida, quantidade esta, insuficiente para a indução da cascata de regulação. Ao final do crescimento exponencial, a síntese de AbrB é reprimida, seguida da indução do fator sigma H (KLEIN *et al.*, 1993; STEIN *et al.*, 2002; KLEEREBEZEM *et al.*, 2004; BONGERS *et al.*, 2005). O fator sigma induz a transcrição de *spaRK* e a Spak histidina quinase é expressa. A partir de uma concentração limiar, a subtilina atua nas vias SpaRK

como um indutor transcricional de *spaS* e *spaBTC*, resultando na produção aumentada de subtilina. Mecanismos semelhantes de regulação são descritos também, para a biossíntese da nisina e mersacidina (KLEEREBEZEM, 2004; KUIPERS *et al.*, 1995; STEIN *et al.*, 2003; SCHMITZ *et al.*, 2006; BURKARD 2007).



**Figura 1.** Organização do cluster gênico e representação da estrutura do peptídeo maduro da subtilina. Adaptado de STEIN, 2005.

#### 2.4.2 Subtilosina A

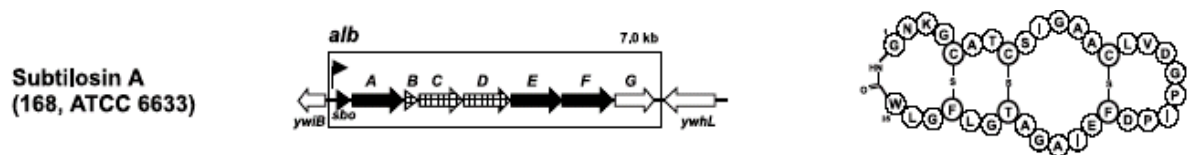
Subtilosina A foi isolada originalmente por Babasaki *et al.* (1985) da linhagem selvagem de *Bacillus subtilis* 168, e a sequência de aminoácidos incompleta foi relatada. A sequência completa foi publicada posteriormente por Zheng *et al.* (1999), e uma elucidação adicional foi fornecida por Marx *et al.* (2001). Determinou-se uma molécula circular de 32 aminoácidos, contendo alguns aminoácidos que são modificados pós-transcricionalmente com três átomos de enxofre com ligação cruzada entre a cisteína e o carbono  $\alpha$  de duas fenilaminas e um resíduo de treonina, sendo um peptídeo de 3,4 kDa (BABASAKI *et al.*, 1985; JACK *et al.*, 1995; NES *et al.*, 1996; KAWULKA *et al.*, 2004).

O operon para a bacteriocina subtilosina A (Fig. 2) é composto por oito genes, *alb*ABCDEFG e *sboA* com 7kb (KUNST *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2000). Estudos da natureza da atividade antilisterial produzidas por linhagens selvagens de *B. subtilis* foram conduzidos. O gene *sboA*, que codifica a bacteriocina subtilosina, e os genes do operon *alb* (*albA* - *G* são, respectivamente, genes *ywiA*, *ywhR*, *ywhQ*, *ywhP*, *ywhO*, *ywhN*, e *ywhM*), funcionam na produção de atividade antilisterial. Os produtos de *albB*, *albC*, e *albD* atuam na imunidade da subtilosina. Uma bactéria produzindo uma bacteriocina é imune a bacteriocina específica que produz (KUNST *et al.*, 1997; KLEANTHOUS *et al.*, 1998; ZHENG *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2009).

A regulação da expressão do operon *sboA-alb* é complexa, sendo induzida em culturas de crescimento tardio aparentemente em resposta à inanição e pela limitação de oxigênio (ZHENG *et al.*, 1999; NAKANO *et al.*, 2000; ALBANO *et al.*, 2005). Muitos dos fatores que governam a expressão dos genes em resposta à inanição e a limitação de oxigênio foram identificados em *B. subtilis* (GROSSMAN, 1995; NAKANO *et al.*, 1996; SUN *et al.*, 1996; O'REILLY & DEVINE, 1997; NAKANO & ZUBER, 1998; MSADEK, 1999; NAKANO *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2000). A transcrição do operon *sboA-alb* é intensamente induzida pela limitação de oxigênio via um sistema de transdução de sinal ResD-ResE, que desempenha um papel fundamental na respiração anaeróbica. Além deste sistema, a proteína reguladora de estado de transição AbrB atua reprimindo a transcrição do operon independentemente da via ResD-ResE (INAOKA *et al.*, 2003). Adicionalmente, Rok, conhecido por ser um regulador do competente desenvolvimento, reprime a transcrição de *sboA-alb*

(ALLENBY *et al.*, 2006). Não se sabe como esses múltiplos fatores de regulação refletem sobre os genes da subtilosina A e seu papel fisiológico, mas sabe-se que as condições de estresse induzem a expressão do operon (O'REILLY & DEVINE, 1997; STRAUCH *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2009).

Subtilosina tem uma comprovada eficácia contra *L. monocytogenes*, como indicado por diferentes estudos (ZHENG *et al.*, 1999; STEIN *et al.*, 2004; SUTYAK *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Isto demonstra uma atrativa opção que deve ser investigada pela indústria alimentar. Shelburne *et al.* (2007) conduziram um estudo mais detalhado em relação ao espectro de atividade antimicrobiana desta bacteriocina. Seus resultados sugerem que a bacteriocina tem a capacidade de atuar contra um amplo espectro de micro-organismos, mas sua ineficácia contra organismos capsulados limitam seu valor prático. Os autores diminuíram a importância da subtilosina como um agente antimicrobiano; isto, entretanto, é contradito por Sutyak *et al.* (2008) que indicam sua utilidade contra patógenos vaginais tais como *Gardnerella vaginalis* e *Streptococcus agalactiae*.



**Figura 2.** Organização do cluster gênico e representação da estrutura do peptídeo maduro de subtilosina A. Adaptado de STEIN, 2005.

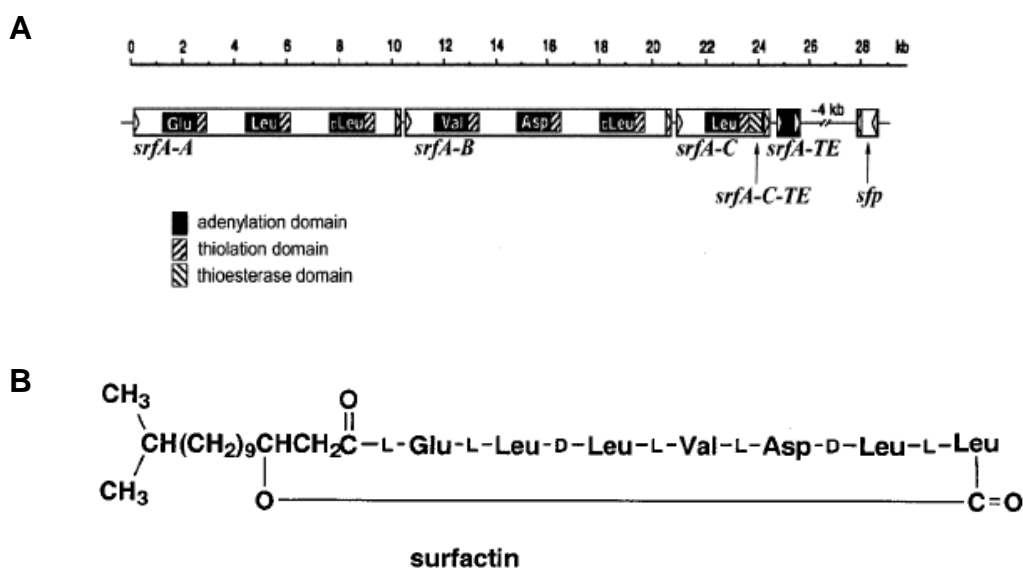
### 2.4.3 Surfactina

O lipopeptídeo biossurfactante, surfactina (Fig. 3), é um composto cíclico de oito membros consistindo em sete aminoácidos e uma parte ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico, com massa molecular de 1050 Da (ARIMA *et al.*, 1968). Estudos genéticos foram empreendidos para identificar genes exigidos na produção da surfactina. Um grande operon de 25 kb, nomeado *srfA*, compreende os genes exigidos para a biossíntese desta bacteriocina e é igualmente responsável pela esporulação e competente desenvolvimento da bactéria (NAKANO *et al.*, 1991; COSMINA *et al.*, 1993). O gene *sfp* (NAKANO *et al.*, 1992), mapeado a 4 kb *downstream* do operon *srfA* e associado com, mas não integrado nos últimos, é o segundo gene essencial para a produção de surfactina. Sua sequência de nucleotídeos foi estabelecida por Nakano *et al.* (1988).

A biossíntese da surfactina é catalisada não ribossomalmente pela ação de um grande complexo multienzimático constituído de quatro blocos modulares, chamados de surfactina sintetase. As surfactinas sintetases, SrfA-A, SrfA-B e SrfA-C, são codificadas pelos primeiros três genes do operon *srfA* (COSMINA *et al.*, 1993; SCHNEIDER *et al.*, 1998). Em particular, a enzima unimodular, SrfA-C, contendo um domínio tioesterase, SrfA-C-TE, localizado em sua extremidade C-terminal, é um dos genes exigidos para a biossíntese da surfactina (SCHNEIDER *et al.*, 1998). Alguns outros resultados (NAKANO *et al.*, 1992; TSUGE *et al.*, 1999) igualmente sugerem que *sfp* tenha um papel regulador assim como um papel mais direto na síntese da surfactina. Em outras palavras, ambos os genes *srfA-C-TE* e o gene *sfp* possuem papéis



determinantes na produção de surfactina (HSIEH *et al.*, 2004; COUTTE *et al.*, 2010). A síntese da surfactina é dependente da fase de crescimento e é induzida durante a transição para a fase estacionária. A transcrição do operon *srf* é conduzida por um promotor sigma A- dependente e regulado por uma complexa rede, incluindo o sistema de dois componentes, ComAP (NAKANO *et al.*, 1991; ROGGIANI & DUBNAU, 1993; STEIN, 2005; CHEN *et al.*, 2009). ComA fosforilada liga-se a montante do operon de surfactina e induz sua expressão. PerR, um repressor geral da regulação de estresse por peróxido mostrou regular o operon *srf* de forma positiva e independente de ComA (HAYASHI *et al.*, 2005). Em contraste, CodY, um regulador global GTP-ativado, atua como um repressor direto em condições de abundância (SERROR & SONENSHEIN, 1996; STEIN, 2005; CHEN *et al.*, 2009).



**Figura 3. (A)** Diagrama esquemático da organização do operon de *srfA* e da localização de *sfp*. Adaptado de NAKANO *et al.*, 1992 e SCHNEIDER *et al.*, 1998. **(B)** Organização da bacteriocina surfactina. Modificado de TORAYA *et al.*, 1995.

Acredita-se que a atividade antimicrobiana da surfactina seja consequência direta da interação deste lipopeptídeo com sua membrana alvo e de sua ação sobre a estabilidade de bicamadas (CARRILLO *et al.*, 2003). A surfactina forma *clusters* com os fosfolipídeos, estabelecendo domínios de surfactina dentro da bicamada (GRAU *et al.*, 1999). Esta molécula pode ainda formar, nas bicamadas, agregados micelares com organização lamelar ou pequenas vesículas fechadas, que solubilizam a membrana biológica, atuando como um detergente nesta estrutura (GRAU *et al.*, 1999; CARRILLO *et al.*, 2003; HEERKLOTZ *et al.*, 2004).

A surfactina sozinha não inibe o crescimento de agentes fitopatogênicos, mas acredita-se que aumenta significativamente a atividade antifúngica da iturina A, através de uma relação sinérgica (HIRAOKA *et al.*, 1992; MAGET-DANA *et al.*, 1992; THIMON *et al.*, 1992; RAZAFINDRALAMBO *et al.*, 1998; COUTTE *et al.*, 2010), provavelmente devido à atividade citolítica da surfactina, ligada à sua potente propriedade surfactante, que enfraquece a membrana celular e facilita o ataque da iturina A (MAGET-DANA *et al.*, 1992; PHAE *et al.*, 1990).

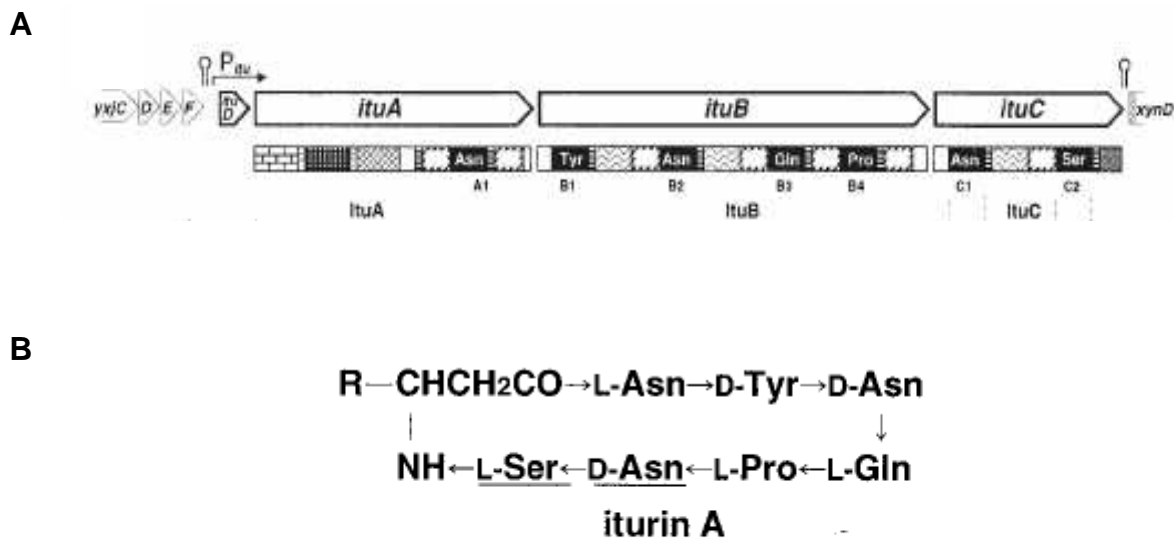
Embora a surfactina tenha sido descoberta aproximadamente 35 anos atrás, houve um aumento no interesse por este composto na década passada, provocada pela demanda crescente por eficazes biossurfactantes, antimicrobianos, anti-virais, anti-tumorais e agentes hemolíticos (KATZ & DEMAIN, 1977; COOPER *et al.*, 1981; NARUSE *et al.*, 1990; HSIEH *et al.*, 2004; ONGENA *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2009). Surfactina indica uma disposição surpreendente de atividades. Até agora, apesar de muitas vantagens desta sobre os agentes químicos, este lipopeptídeo tem tido poucas aplicações,

principalmente por causa da baixa produtividade da linhagem e da necessidade por substratos caros (DESAI & BANAT, 1997; PEYPOUX *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2010).

#### 2.4.4 Iturina A

Iturina A é um lipopeptídeo cíclico contendo sete resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos e um resíduo de um  $\beta$ -aminoácido sintetizado não ribossomalmente, com massa molecular de 1042 Da, aproximadamente (MAGET-DANA & PEYPOUX, 1994; GRAU *et al.*, 2000). O operon desta bacteriocina compreende uma região de aproximadamente 38 kb e é composta de quatro fases aberta de leitura: *ituD*, *ituA*, *ituB*, e *ituC* (Fig. 4). O gene *ituD* codifica uma malonil CoA transacilase, cujo rompimento do gene conduz à deficiência específica na produção da iturina A. Os genes *ituB* e *ituC*, codificam peptídeos sintetases que sintetizam cadeias peptídicas precursoras para a formação da ItuA (HIRAOKA *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 1993; KUNST *et al.*, 1997; TSUGE *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2008). Evidências demonstram que a expressão desta bacteriocina é induzida durante a fase estacionária (DUITMAN *et al.*, 1999; TSUGE *et al.*, 2001). Três reguladores globais, DegU, DegQ, ComA e os fatores sigma B ( $\sigma^B$ ) e H ( $\sigma^H$ ) foram identificados por atuarem de forma positiva na ativação transcricional do promotor *itu* ( $P_{itu}$ ). O controle direto sobre  $P_{itu}$  é exercida por DegU, que ocupa dois locais distintos no promotor (KOUMOUTSI *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009). Em contraste, ComA controla a expressão indireta do operon através de DegQ,

que serve como um fator auxiliar para DegU. ComA é um regulador de genes de competência tardia (GUILLEN *et al.*, 1989) e da produção de surfactina (ROGGIANI & DUBNAU, 1993; SHIMANE & OGURA, 2004). DegU é um regulador de resposta de um sistema que controla muitos processos celulares, incluindo desenvolvimento de competências, capacidade de resposta osmótica, e desencadeamento de reações pós-fase de crescimento exponencial em condições limitantes (DAHL *et al.*, 1992; KUNST & RAPOPORT, 1995; DARTOIS *et al.*, 1998; STEIL *et al.*, 2003; KOUMOUTSI *et al.*, 2007).



**Figura 4.** (A) Diagrama esquemático da organização do operon da iturina A. (B) Organização da bacteriocina iturina A. Modificado de TSUGE *et al.*, 2001.

Esta bacteriocina demonstra uma atividade antifúngica com um espectro amplo de ação, o que a torna um agente de controle biológico potencialmente ideal com o objetivo de reduzir o uso de antifúngicos químicos na agricultura (SANDRIN *et al.*, 1990; MAGET-DANA & PEYPOUX, 1994; YU *et al.*, 2002; STEIN, 2005; CHO *et al.*, 2009; ARREBOLA *et al.*, 2010). De fato, a atividade antifúngica de *B. subtilis* pode ser atribuída, em grande parte, a

produção de iturina A (TSUGE *et al.*, 2001; ARREBOLA *et al.*, 2010). Além disso, triagens clínicas em seres humanos e animais igualmente mostraram iturina A sendo uma droga valiosa devida seu amplo espectro antifúngico, baixa toxicidade, e baixo efeito alérgico (DE LUCCA & WALSH, 1999; MAGET-DANA & PEYPOUX, 1994; YAO *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2010).

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

Apesar de muitas vantagens desta bacteriocina sobre agentes químicos, iturina A tem tido poucas aplicações até o presente momento, principalmente por causa da baixa produtividade pelas linhagens e os custos de produção relativamente elevados (HUANG *et al.*, 1993; OHNO *et al.*, 1993; SZCZECH & SHODA, 2006; TOKUDA *et al.*, 1993; YU *et al.*, 2002).

## **2.5 Bacteriocinas produzidas por linhagens bacterianas isoladas de diferentes ambientes**

Estudos realizados com as bacteriocinas MR10A e MR10B produzidas por *Enterococcus faecalis* MRR 10-3 isolada da glândula uropigiana

da ave *Upupa epops* demonstram que essas são variantes das enterocinas L50A e L50B. Apesar disso, diversos traços demonstram que as bacteriocinas são diferentes. Primeiramente, as enterocinas L50A e L50B não apresentam atividade contra *Escherichia coli*; em segundo, as mesmas são codificadas por plasmídeo (CINTAS *et al.*, 1998; FLORIANO *et al.*, 1998), visto que os genes de MR10 são obrigatoriamente localizados no cromossomo; em terceiro, as linhagens produtoras de L50A e L50B pertencem a espécie *Enterococcus faecium*, enquanto as enterocinas MR10A e MR10B foram produzidas por *E. faecalis*. As bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* poderiam alargar a escala de substâncias uropigianas antimicrobianas e auxiliar *U. epops* a defender-se de doenças causadas por *Bacillus licheniformis* tais como degradação da pena (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2006).

Em relação à bacteriocina RC714 produzida por uma linhagem de *Enterococcus faecium* isolada de uma amostra clínica resistente a vancomicina, foi identificada uma identidade de 88% e uma similaridade de 92% com a bacteriocina 31 produzida por uma linhagem *E. faecalis*. Uma diferença de 5 dos 42 aminoácidos da respectiva com a bacteriocina 31 foi observada. Baseado na sequência de aminoácidos da porção N-terminal, a bacteriocina RC714 pode representar uma nova bacteriocina, diferente da bacteriocina 31 (DEL CAMPO *et al.*, 2001).

Recentes relatos demonstram que a proteína produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* é idêntica a bacteriocina subtilosina A, a qual é produzida por *Bacillus subtilis* (SUTYAK *et al.*, 2008). Embora haja casos documentados da produção da subtilosina por diversas subespécies de *B. subtilis* e estreitamente relacionada com espécies de *Bacillus atrophaeus*

(STEIN *et al.*, 2004), este é o primeiro relato da produção original em *B. amyloliquefaciens* (XU & CÔTÉ, 2003).

Motta *et al.* (2004) estudaram diferentes linhagens bacterianas provenientes de ambiente aquático da região Amazônica, Brasil. Dentre as linhagens estudadas, 59 apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos, uma bactéria indicadora. As bactérias foram bioquimicamente e morfológicamente caracterizadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, porém a grande maioria das espécies e bacteriocinas não foram caracterizadas e identificadas. O grupo ressalta a importância e a necessidade de se estudar e explorar esses compostos antimicrobianos que poderão ser amplamente aplicados em diversos segmentos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho propõe verificar a presença de genes de bacteriocinas em diferentes linhagens de *Bacillus* isoladas de intestino de peixes da Região Amazônica, Brasil.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a presença dos genes responsáveis pela competente produção de subtilosina A, subtilina, iturina A e surfactina nas linhagens isoladas.
- b) Desenvolver uma metodologia rápida para detecção dos genes responsáveis pela produção de subtilosina A e subtilina.
- c) Verificar a capacidade inibitória no crescimento de fungos fitopatogênicos e a atividade hemolítica das bactérias isoladas da Região Amazônica.
- d) Confirmar a produção de substâncias antimicrobianas através do MALDI-TOF.
- e) Comparar a expressão dos genes *sboA* e *ituD* entre os diferentes isolados de *Bacillus* amazônicos e *Bacillus subtilis* ATCC 19659.
- f) Avaliar a influência do pH inicial e da temperatura na expressão de genes essenciais para a produção das bacteriocinas subtilosina A e iturina A através da metodologia de qRT-PCR.



## **4 CAPÍTULOS**

### **4.1 CAPÍTULO I**

**Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing remarkable inhibition of phytopathogenic fungi**

Renata V. Velho, Luis F. C. Medina, Jéferson Segalin e Adriano Brandelli

Artigo submetido para publicação no periódico *Journal of Basic Microbiology*.

**ABSTRACT**

The biological activity and the presence of genes *sfp* and *ituD* (surfactin and iturin A) among *Bacillus* strains isolated from Amazon basin were investigated. *Bacillus* spp. were tested for hemolytic activity and inhibition of fungal growth by agar plate assays in parallel with PCR for identification of *sfp* and *ituD* genes. All strains tested produced surface-active compounds, evidenced by lysis of erythrocytes and emulsifying activity on mineral oil and soybean oil. These strains of *Bacillus* caused growth inhibition of several phytopathogenic fungi, including *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. and *Bipolaris sorokiniana*. The presence of genes *ituD* and *sfp* was confirmed by PCR and sequence analysis. The only exception was *Bacillus* sp. P34 that lacks *sfp* gene. Lipopeptides were isolated from culture supernatants and analyzed by mass spectrometry. Characteristic *m/z* peaks for surfactin and iturin were observed, and some strains also produced fengycin and bacillomycin. The remarkable antifungal activity showed by the strains could be associated with the co-production of multiple lipopeptide antibiotics. Screening for novel bacteria producing useful biosurfactants or biocontrol agents for agriculture is a topic of greatest importance to eliminate chemical pollutants.

**Key words:** antimicrobial peptide; bacteriocin; surfactin; iturin; *Bacillus*

## INTRODUCTION

The genus *Bacillus* includes several industrially important species and has a historical of safe use in foods and industry. Enzymes, antibiotics, amino acids and antifungal peptides are part of the many commercially available products from *Bacillus* spp. The production of bacteriocins or bacteriocins-like substances has also been described for this genus, and subtilin, subtilosin A, iturin A and surfactin are some examples of these substances [1,2].

The antimicrobial peptide surfactin is a cyclic heptapeptide produced by strains of *Bacillus subtilis*. Surfactin has amphiphilic properties and a growing interest on this compound has been triggered by increasing demand for effective biosurfactants, especially as an attractive alternative to chemical surfactants that have a detrimental effect to the environment [3,4]. Surfactin has been also investigated in potential applications in the field of biomedical sciences like antimicrobial activity, inhibition of fibrin clot formation, antiviral and antitumor activities, and enzyme inhibition [5]. The genes responsible for production of surfactin are organized in a large operon in *B. subtilis* and the gene *sfp*, responsible for production of enzyme 4'-phosphopantetheinyltransferase was characterized as essential to production of surfactin [6,7].

Iturin A, a member of the iturin group, shows strong antibiotic activity against a broad spectrum of fungi, making it a potential agent for biological control with the aim of reducing the use of chemical pesticides in agriculture [8,9]. Iturins are molecules of a heptapeptide linked to a  $\beta$ -amino fatty acid. In fact, the antifungal activity of *B. subtilis* can be attributed, to a certain extent, to its production of iturin A [10]. In addition, clinical trials on humans and animals

have also been shown that iturin A is a valuable drug due to its broad antifungal spectrum, low toxicity, and low allergic effect [9,11]. Gene clusters involved in iturin A synthesis have been intensively investigated [10,11]. The iturin A operon spans a region more than 38 kb long and is composed of four open reading frames: *ituD*, *ituA*, *ituB*, and *ituC*. The *ituD* gene encodes a putative malonyl coenzyme A transacylase, whose disruption results in a specific deficiency in iturin A production [10].

The Amazon basin is a source of enormous biological diversity, although studies on the microbial life of this region are relatively scarce [12,13]. This potential for screening biotechnologically relevant microorganisms has been the object of some investigations [14,15,16]. The aim of this work was the screening for peptides surfactin and iturin A among *Bacillus* strains isolated from aquatic environments of Brazilian Amazon basin, using a simple and efficient PCR method with specific primers *sfp* and *ituD*. Inhibition of phytopathogenic fungi and biosurfactant activity by these *Bacillus* strains was also investigated.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains and culture media**

Bacterial strains used in this work included bacteria from aquatic environments of the Amazon region, near Manaus, Brazil (3°06'S, 60°01'W). They were kindly provided by Dr. Spartaco Astolfi Filho (Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil) and are listed in Table 1. The control strain used in the experiments was *B. subtilis* ATCC 19659. Bacteria were maintained at -21°C in BHI broth containing 20% (v/v) glycerol, and were cultivated in TSA agar plates

for 24 h at 37°C and then in TSB broth (Mast Diagnostics) for 24 h at 37°C before utilization.

**Table 1.** Bacterial strains used in this study.

Bacterial strains <sup>a</sup>	Origin (reference)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	Culture collection
<i>Bacillus</i> sp. P34 (AY962472)	<i>Leporinus</i> sp. (Motta et al., 2007)
<i>Bacillus licheniformis</i> P40 (AY962473)	<i>Leporinus</i> sp. (Cladera-Olivera et al., 2004)
<i>Bacillus</i> sp. P7 (DQ387865)	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Giongo et al., 2007)
<i>Bacillus</i> sp. P11 (DQ387864)	<i>Leporinus</i> sp. (Giongo et al., 2007)
<i>Bacillus subtilis</i> P45B (AY962474)	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Sirtori et al., 2006)

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection. Numbers within parenthesis corresponds to GenBank accession numbers. Strains P7 and P11 clustered with *B. subtilis*, *B. velesensis* and *B. amyloliquefaciens*.

### Screening for biosurfactant activity on blood agar plates

The method used by Hsieh et al. [7] was modified as follows. Colonies of *Bacillus* spp. strains were selected and grown for 24 h in TSB broth at 37°C and inoculated onto Columbia sheep blood Agar plates (Difco, Detroit, USA). The plates were incubated for 24-48 h at 37°C. The presence of a hemolysis zone around the colony is observed for strains producing a biosurfactant.

### Emulsifying activity

The capacities of bacteria to emulsify several hydrophobic substances were tested. Bacteria were grown in TSB broth for 24 h at 37°C and then culture supernatants were obtained by centrifugation at 10,000 x g for 15 min at 4°C.

The supernatants were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane (Millipore, Billerica, MA, USA), and the filtrates were considered as crude preparations. Crude preparations were mixed with 10 mL of soybean oil and mineral oil and allowed to stand for 24 h at room temperature [17]. After this time the emulsifying index (E<sub>24</sub>) was determined by:

$$E_{24} = (\text{height of the emulsion layer} / \text{height of the total layer}) \times 100$$

### **Fungal growth inhibition assay**

Fungal isolates were inoculated on plates with PDA (Difco, Detroit, USA) for 7 days and 12 h photoperiod. Saline solution (3 mL) was poured on each of the colonies and the spores removed with the aid of a Drigalski loop. The suspension was collected and transferred to a sterile tube. The number of conidia was determined in a Neubauer chamber and the concentration adjusted to  $5 \times 10^3$  conidia/mL. One mL of this suspension was added to 99 mL of sterile PDA to 45°C homogenized and transferred to a plate [18].

Each bacterial strain was inoculated by stick in 4 points of each plate previously prepared with the fungal inoculum. The inhibition zones were measured after five days of incubation at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  and 12 h photoperiod.

### **DNA extraction**

DNA was extracted from overnight cultures of strains using the Promega Wizard SV Genomic DNA kit (Promega Corp., Madison, WI, USA).

### PCR testing

Amplifications of *sfp* and *ituD* genes were carried out by PCR with specific primers. Primers *sfp-f* (5' ATGAAGATTTACGGAATTTA 3') and *sfp-r* (5' TTATAAAAGCTCTTCGTACG 3') were used for amplifications of 675 bp *sfp* fragment, corresponding to the *Bacillus subtilis* surfactin [7], whereas primers *ituD-f* (5' ATGAACAATCTTGCCTTTTAA 3') and *ituD-r* (5' TTATTTTAAAATCCGCAATT 3') were employed for the 1203 bp *ituD* fragment, corresponding to the *Bacillus amyloliquefaciens* iturin A [19]. PCR was conducted using a Mastercycler® Personal Eppendorf (Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Germany) under the following parameters: denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 50°C, and elongation for 1.5 min at 72°C for a total of 30 cycles for iturin A and denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 30 s at 46°C, and elongation for 1 min at 72°C for a total of 25 cycles for surfactin.

### Sequencing methods

PCRs products were sequenced in the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems). The BLAST algorithm was used to retrieve for homologous sequences in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the software CLUSTAL W, version 1.8 [20].

### **Lipopeptide isolation and mass spectrometry**

The isolation of lipopeptides was performed by acid precipitation as described by Cooper et al. [21]. Samples concentrated in a vacuum centrifuge (SpeedVac SC100, Savant, USA) were dissolved in ethanol and analyzed by mass spectrometry in a MALDI-TOF mass spectrometer (Ettan MALDI-TOF ProSystem, Amersham Biosciences, Sweden) operating in reflecton mode and using a matrix of  $\alpha$ -ciano-4-hydroxycinnamic acid.

## **RESULTS**

### **Biosurfactant activity**

Inoculation of blood agar plates with *Bacillus* spp. strains resulted in clear rings of lysed erythrocytes around each colony. The lysis of red blood cells was related to the production of highly surface-active compounds by *Bacillus* spp. strains. All 6 strains tested showed a hemolytic zone (Table 2). The putative emulsifying activities of these substances were then investigated. The crude preparations showed emulsifying activity against hydrophobic compounds, like soybean oil and mineral oil (Table 2).



**Table 2.** Hemolysis and emulsifying activity among *Bacillus* strains.

Strains	Hemolysis	E <sub>24</sub> (%)	
		Mineral oil	Soybean oil
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	+	43 ± 6	45 ± 8
<i>Bacillus</i> sp. P34	+	48 ± 1	27 ± 9
<i>Bacillus licheniformis</i> P40	+	43 ± 1	20 ± 4
<i>Bacillus</i> sp. P7	+	46 ± 4	34 ± 8
<i>Bacillus</i> sp. P11	+	48 ± 0	42 ± 6
<i>Bacillus subtilis</i> P45B	+	44 ± 3	43 ± 5

### Antifungal activity

*Bacillus* strains were tested for their antifungal activity. Among the species tested, *Fusarium oxysporum f. lycopersici* is considered the most sensitive to screening iturin A producing strains [19]. Five strains could inhibit the growth of all phytopathogenic fungi tested (Table 3). Excepting for the control strain *B. subtilis* ATCC 19659, the Amazonian strains showed prominent inhibition against *Fusarium* spp. and *Bipolaris sorokiniana*. *Aspergillus* spp. were also inhibited by these bacteria, but to a lesser extent.

**Table 3.** Antifungal activity among *Bacillus* strains.

Strains	Antifungal activity <sup>a</sup>					
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Bipolaris</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>
	<i>flavus</i>	<i>niger</i>	<i>phoenicis</i>	<i>sorokiniana</i>	<i>oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i>	<i>graminearum</i>
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. P34	+	+	+	++	+++	+++
<i>B. licheniformis</i> P40	+	+	+	++	+++	+++
<i>Bacillus</i> sp. P7	+	+	+	+++	+++	+++
<i>Bacillus</i> sp. P11	+	+	+	+	+++	+++
<i>B. subtilis</i> P45B	++	+	++	+++	+++	+++

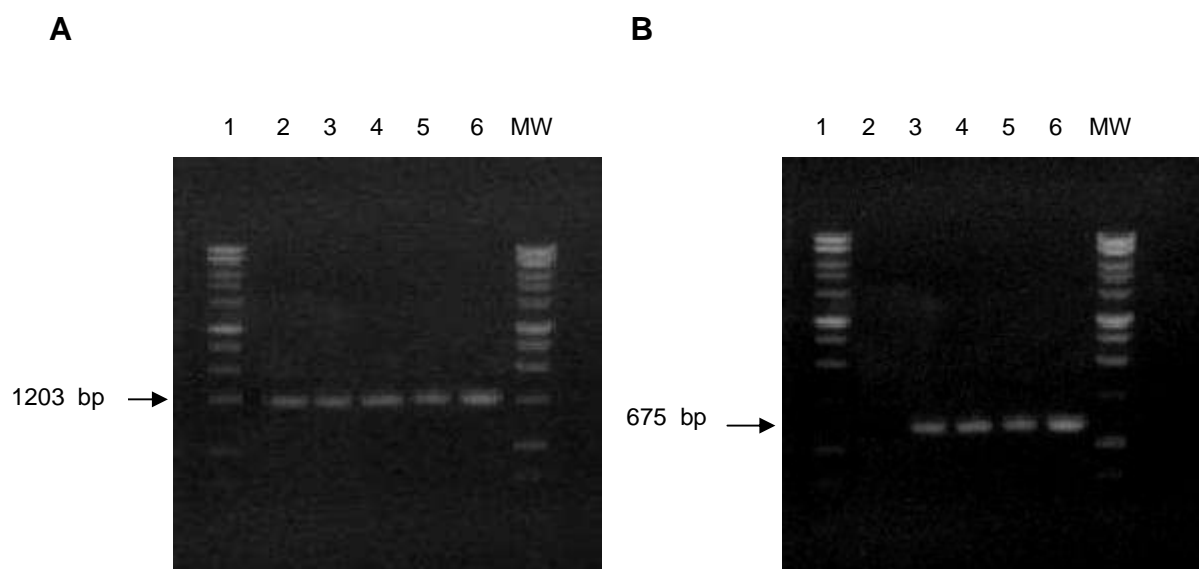
<sup>a</sup> Four levels of antifungal activity as measured by inhibition of growth are defined as follows: +, 5 < inhibition zone ≤ 10 mm; ++, 10 < inhibition zone ≤ 15 mm; +++, inhibition zone >15 mm. Data were derived from three trials with three replicates per trial.

### Identification of genes *ituD* and *sfp*

PCR analysis showed that all strains exhibited a 1203 bp fragment (Fig. 1), for the functional gene-encoding malonyl Coa transacylase (*ituD*). Tested strains showed a 675 bp fragment (Fig. 1) encoding a putative transcription terminator gene (*sfp*), which is also responsible for sporulation and competence development. The only exception was *Bacillus* sp. P34.

The fragments obtained by PCR were sequenced. All sequences of 1203 bp fragments showed elevated homologies (minimum identity 98%) with the gene encoding malonyl CoA transacylase (*ituD*), and only point mutations were observed. When analyzed these single nucleotide changes result in silent

mutations. Similarly, the sequences of 675 bp fragments had high homologies (minimum identity 97%) to the putative transcript terminator gene (*sfp*), which also corresponded to silent mutations only.



**Fig. 1** PCR product profiles of (A) *ituD* gene and (B) *sfp* gene. 1, Molecular weight marker; 2, *Bacillus* sp. P34; 3, *Bacillus* sp. P11; 4, *Bacillus* sp. P7; 5, *Bacillus subtilis* P45B; 6, *Bacillus licheniformis* P40.

### Lipopeptide isolation and mass spectrometry

The lipopeptide compounds were isolated from the cell-free culture supernatant of *Bacillus* spp. In order to determine accurately the molecular mass of the antimicrobial peptides, mass spectroscopy analysis was carried. For all samples, the mass spectra revealed clusters with major peaks at  $m/z$  1000-1100 Da, corresponding to isoforms of iturin and surfactin lipopeptides (Table 4). The strain P7 showed a broad distribution including a cluster of 6 peaks that

were observed between  $m/z$  1016 and 1096, and another cluster with peaks at  $m/z$  1450, 1064, 1483 and 1498 (Fig. 2).

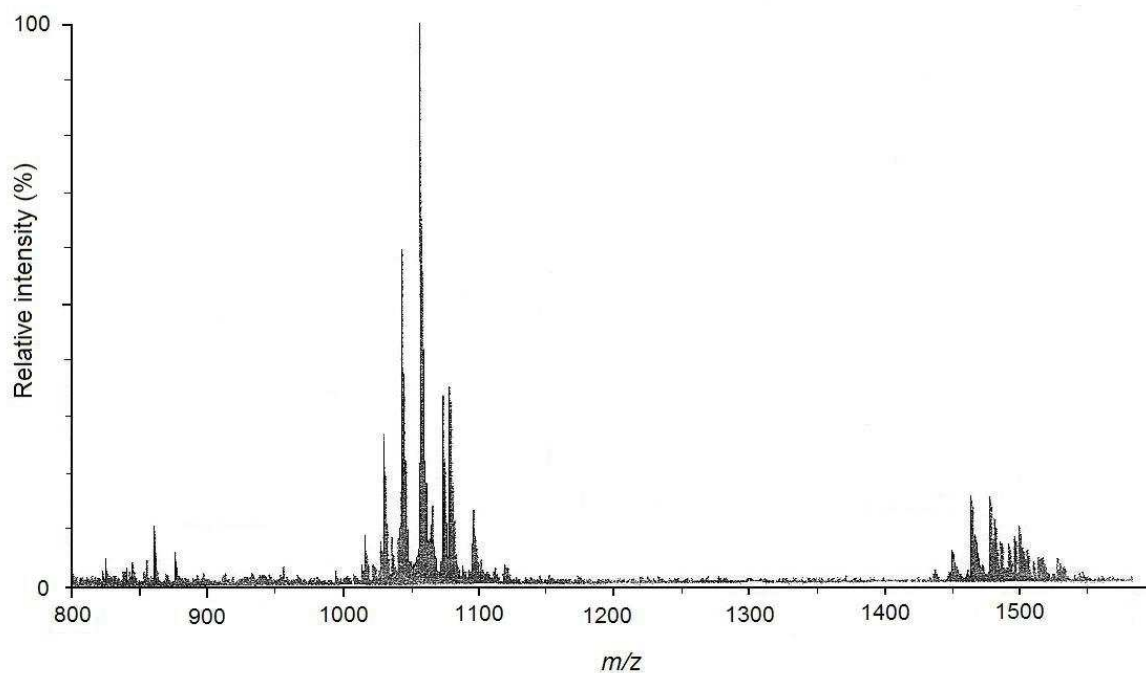
**Table 4.** Assignments of major  $m/z$  peaks observed in mass spectra of lipopeptides from *Bacillus* spp.

Strain			$m/z$	Assignment <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	19659	1045.1	C14 surfactin A [M+Na] <sup>+</sup>
			1059.1	C15 surfactin A [M+Na] <sup>+</sup>
			1060.6	C14 surfactin A [M+K] <sup>+</sup>
			1075.1	C15 surfactin A [M+K] <sup>+</sup>
<i>Bacillus</i> sp. P34			1043.1	C14 iturin A [M+H] <sup>+</sup>
			1057.1	C15 iturin A [M+H] <sup>+</sup>
			1449.9	C15 fengycin A [M+H] <sup>+</sup>
			1463.8	C16 fengycin A [M+H] <sup>+</sup>
			1477.8	C17 fengycin A [M+H] <sup>+</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i> P40			1057.8	C15 iturin A [M+H] <sup>+</sup>
			1079.8	C15 iturin A [M+Na] <sup>+</sup>
			1121.7	Bacillomycin F [M+Na] <sup>+</sup>
			1138.6	Bacillomycin F [M+K] <sup>+</sup>
<i>Bacillus</i> sp. P7			1016.8	C13 surfactin val7[M+Na] <sup>+</sup>
			1030.8	C13 surfactin leu7[M+Na] <sup>+</sup>
			1044.8	C14 surfactin leu7[M+Na] <sup>+</sup>
			1058.8	C15 surfactin A [M+Na] <sup>+</sup>
			1060.8	C14 surfactin A [M+K] <sup>+</sup>

	1079.7	C15 iturin A [M+Na] <sup>+</sup>
	1096.8	C15 iturin A [M+K] <sup>+</sup>
	1450.0	C15 fengycin A [M+H] <sup>+</sup>
	1464.0	C16 fengycin A [M+H] <sup>+</sup>
	1483.1	C16 fengycin A [M+Na] <sup>+</sup>
	1498.1	C17 fengycin A [M+Na] <sup>+</sup>
<i>Bacillus</i> sp. P11	1042.7	C14 iturin A [M+H] <sup>+</sup>
	1079.8	C15 iturin A [M+H] <sup>+</sup>
	1121.8	Bacillomycin F [M+Na] <sup>+</sup>
	1138.6	Bacillomycin F [M+K] <sup>+</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> P45B	1044.7	C14 surfactin A [M+Na] <sup>+</sup>
	1058.7	C15 surfactin A [M+Na] <sup>+</sup>
	1074.7	C15 surfactin A [M+K] <sup>+</sup>
	1122.0	Bacillomycin F [M+Na] <sup>+</sup>

---

<sup>a</sup> Assignments according to Stein (2008), Vater et al. (2002), Chen et al. (2008).



**Fig. 2** MALDI-TOF spectrum of lipopeptides from *Bacillus* sp. P7.

## DISCUSSION

The genes *sfp* and *ituD*, related to production of antimicrobial peptides surfactin and iturin A, respectively, were identified in different *Bacillus* strains isolated from aquatic environments of Brazilian Amazon basin. These bacteria showed antifungal activity against species that cause important economical losses in agriculture. In addition, the inhibition of bacterial pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* by these strains was previously described [16].

All strains caused hemolysis on blood agar and showed emulsifying capability on mineral oil and soybean oil. However, *Bacillus* sp. P34 showed a negative result for surfactin isolation in agreement with a negative PCR for *sfp*. Although the method of Hsieh et al. [7] was developed to investigate surfactin

among *B. subtilis* and related species, the lysis of red blood cells could be related to the production of highly surface active compounds other than surfactin. In fact, *Bacillus* sp. P34 produces other lipopeptides in the range of 1450-1500 Da.

Biosurfactants have an advantage over synthetic surfactants because most are biodegradable and generally less toxic [5]. At present, however, the use of biosurfactants in the food and chemical industries is not generally competitive because of the relatively high production costs. Thus, the identification of strains showing productivity levels compatible with economic needs is a topic of utmost relevance, which requires the development of simple and reliable methods to select surfactin-producing strains.

MALDI-TOF has been used as an efficient tool for identification of antimicrobial peptides, including hydrophobic lipopeptides in the range of 1-1.5 kDa [22]. The analysis of the mass spectra of antimicrobial peptides of *Bacillus* spp. indicated characteristic peaks for surfactin isoforms, including  $[M+Na]^+$  and  $[M+K]^+$  ions. The peaks at  $m/z$  1042-1095 agree with isomers of iturin A described for *B. amyloliquefaciens* RC-2 [23] and *B. amyloliquefaciens* CCMI 1051 [24]. Peaks with similar  $m/z$  values to bacillomycin F were also identified for some strains. The strain P7 showed a broad range of  $m/z$  peaks, indicating that this bacterium produces a complex mixture of antimicrobial peptides. These results suggest that antifungal activity of these strains is associated with the lipopeptides iturin and/or surfactin, and P7 and P34 also produce fengycins.

The co-production of surfactin and iturin A by the same bacterial strain could be advantageous, since a synergistic effect of surfactin on the activity of iturin A was earlier demonstrated [25]. The simultaneous production of these

substances has been only reported for *B. subtilis* [8,25,26], and possibly for *B. amyloliquefaciens* [27]. Co-production of three or more lipopeptide antibiotics, as observed for strain P7, is not usual. These results agree with the fact that production of antimicrobial lipopeptides by *Bacillus* spp. is under complex regulation and a same strain can produce different peptides [1,11]. The co-production of different lipopeptides by *Bacillus* spp. may difficult the purification, and the huge structural variability makes it complicated to definitively identify different lipopeptides and their homologues [24,28].

Iturin A production is often an important factor conferring antifungal activity to *Bacillus* strains. By interacting mostly with ergosterol molecules, iturin A disrupt fungal cytoplasmatic membrane and creates transmembrane channels, which permit the release of essential ions [29]. In this study, *Bacillus* strains presenting the *ituD* gene had inhibitory activity against *Aspergillus* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum f. lycopersici* and *Fusarium graminearum*. Only *B. subtilis* ATCC 19659 lacks this activity, which agrees with the fact that this strain did not produce iturin under the conditions used in this study.

The research on new microbial strains as biocontrol agents in agriculture or to produce biosurfactants to remove compounds like oils or polyaromatic hydrocarbons is a topic of utmost importance to search for alternative tools to eliminate chemical pollutants. To sum up, this study identified novel bacterial isolates bearing the essential genes to produce iturin A and surfactin and showing significant activity against phytopathogenic fungi. These bacteria have potential use for the production of antifungal and/or biosurfactant preparations



demonstrating advantages comparable to those of *Bacillus subtilis* ATCC 19659.

### Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Brazil). RV received a M.Sc. scholarship from CAPES (Brazil).

### References

- [1] Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, **56**, 845-857.
- [2] Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K., 2006. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 139-149.
- [3] Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 553-563.
- [4] Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, **133**, 183-198.
- [5] Singh, P., and Cameotra, S.S., 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.*, **22**, 142-147.
- [6] Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J., and Zuber, P., 1992. Isolation and characterization of *sfp*: A gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 313-321.

- [7] Hsieh, F.C., Li, M.C., Lin, T.C., and Kao, S.S., 2004. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.*, **49**, 186-191.
- [8] Sandrin, C., Peypoux, F., and Michel, G., 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 370-375.
- [9] Maget-Dana, R., and Peypoux, F., 1994. Iturins, a special class of poreforming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. *Toxicology*, **87**, 151-174.
- [10] Tsuge, K., Akiyama, T., and Shoda, M., 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.*, **183**, 6265-6273.
- [11] Yao, S., Gao, X., Fuchsbaue, N., Hillen, W., Vater, J., and Wang, J., 2003. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.*, **47**, 272-277.
- [12] Borneman, J., and Triplett, E.W., 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence of unusual microorganisms and microbial population shifts with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2647-2653.
- [13] Chies, J.M., Dias, A.C.O., Maia, H.M.M., and Astolfi-Filho, S., 2002. *BanAI* a new isoschizomer of type II restriction endonuclease *HaeIII* discovered in *Bacillus anthracis* isolate from Amazon basin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **215**, 95-101.

- [14] Bastos, A.E.R., Moon, D.H., Rossi, A., Trevors, J.T., and Tsai, S.M., 2000. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Arch. Microbiol.*, **174**, 346-352.
- [15] Cladera-Oliveira, F., Caron, G.R., and Brandelli, A., 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett. Appl. Microbiol.*, **38**, 251-256.
- [16] Motta, A.S., Cladera-Oliveira, F., and Brandelli, A., 2004. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Braz. J. Microbiol.*, **35**, 307-310.
- [17] Willumsen, P.A., and Karlson, U., 1997. Screening of bacteria isolated from PAH contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, **7**, 415-423.
- [18] Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H.A.S., and Harbour, A., 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumillus* CL45. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 97-108.
- [19] Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M., and Kao, S.S., 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.*, **56**, 1-5.
- [20] Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- [21] Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B., and Kosaric, N., 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous

- product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 408-412.
- [22] Stein, T., 2008. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lanthibiotic-producing bacteria. *Rapid Commun. Mass Spectr.*, **22**, 1146-1152.
- [23] Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., and Fujii, Y., 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, **61**, 693-698.
- [24] Caldeira, A.T., Feio, S.S., Arteiro, J.M.S., Coelho, A.V., and Roseiro, J.C., 2008. Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 808-816.
- [25] Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., and Michel, G., 1992. Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 144-151.
- [26] Ahimou, F., Jacques, P., and Deleu, M., 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 749-754.
- [27] Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M., and Garcia, A.F., 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1247-1256.
- [28] Chen, H., Wang, L., Su, C.X., Gong, G.H., Wang, P., and Yu, Z.L., 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **47**, 180-186.

- [29] Latoud, C., Peypoux, F., and Michel, G., 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modification of membrane permeability and lipid composition. *J. Antibiot.*, **11**, 1588-1595.
- [30] Motta, A.S., Cannavan, F.S., Tsai, S.M., and Brandelli, A., 2007. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch. Microbiol.*, **188**, 367-375.
- [31] Giongo, J.L., Lucas, F.S., Casarin, F., Heeb, P., and Brandelli, A., 2007. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 375-382.
- [32] Sirtori, L.R., Cladera-Olivera, F., Lorenzini, D.M., Tsai, S.M., and Brandelli, A., 2006. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **52**, 357-363.
- [33] Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., and Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 6210-6219.

## 4.2 CAPÍTULO II

### **Presence of subtilisin A and subtilin among *Bacillus* strains of the Amazon basin**

Renata V. Velho, Ana Paula Basso, Jéferson Segalin, Luis F. C. Medina e  
Adriano Brandelli

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *World Journal of  
Microbiology and Biotechnology*.

## ABSTRACT

This report demonstrates the usefulness of using PCR for the genes *spaS* and *sboA* as a means of identifying *Bacillus* strains with potential to produce subtilin and subtilosin A. PCR analyses were performed on one collection strain and five *Bacillus* spp. isolated from aquatic environments of Amazon basin. All strains yielded positive results for *spaS* and *sboA* genes. Antimicrobial peptides were isolated from culture supernatants and analyzed by mass spectrometry. For all samples, the mass spectra revealed clusters with major peaks at  $m/z$  3250-3500 Da, corresponding to subtilosin A, subtilin and isoforms of these peptides. These results suggest that the antimicrobial activity of these strains may be associated to the production of subtilosin A and/or subtilin. This study identified novel *Bacillus* strains bearing the essential genes to produce subtilosin A and subtilin using a simple and efficient PCR method with specific primers *sboA* and *spaS* developed for this study.

**Key words:** bacteriocin; *Bacillus*; polymerase chain reaction; food preservation; subtilosin A; subtilin

## Introduction

Many peptide antibiotics possess bactericidal, fungicidal and immunomodulating activities, being frequently found as secondary metabolites produced by various microorganisms. Among *Bacillus* species, some antimicrobial peptides, such as bacteriocins, are gene encoded and synthesized ribosomally while others are non-ribosomally produced by the multienzyme thiotemplate mechanism (Jack et al. 1995; Cotter et al. 2005).

Subtilisin A is the only anionic, circular antimicrobial peptide produced by a wild strain of *Bacillus subtilis* (Babasaki et al. 1985). Current findings indicate that the production of mature subtilisin A requires the expression of eight (*sboA-albABCDEFG*) of the nine genes identified in the *B. subtilis* producer strains. These clustered genes are transcribed from a promoter residing upstream of the *sboA* gene and their products are involved in the posttranslational modification and processing of presubtilisin, secretion and immunity. The *albABCDEFG* genes are believed to constitute an operon that encodes the proteins that function in presubtilisin processing and subtilisin export. The *sboA* gene encodes presubtilisin, which is a 43-amino-acid peptide (Zheng et al. 1999; Zheng et al. 2000).

Subtilin is a lanthionine-containing peptide antibiotic (lantibiotic) very similar to nisin, which is the most important member of the group of linear lantibiotics and is used as a food preservative. The biosynthesis of this bacteriocin is based on the expression of ten genes that are organized in a gene cluster *spaBTCSIFEGRK*. The *spaS* gene encodes the prepeptide of subtilin, in which amino acids are enzymatically modified by the products of genes *spaB* and *spaC*. The modified precursor is transported through the



cytoplasmic membrane by the ABC transporter encoded by *spaT*, which appears to be associated with a complex membrane with enzymes SpaB and SpaC (Klein and Entian 1994; Stein et al. 2003).

Amazon basin is a source of enormous biological diversity for microorganisms with potential value for commercial applications (Chies et al. 2002). The screening for microorganisms biotechnologically relevant has been the object of some investigations (Cladera-Olivera et al. 2004; Motta et al. 2004). The aim of this work was the screening for genes of antimicrobial peptides subtilisin A and subtilin among *Bacillus* strains isolated from fish intestine of Brazilian Amazon basin, using a simple and efficient PCR method with the specific primers *sboA* and *spaS*.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains and culture media**

Bacterial isolates were kindly provided by Dr. Spartaco Astolfi Filho (Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil) and are listed in Table 1. Bacteria were maintained at -21°C in BHI broth containing 20% (v/v) glycerol, and were cultivated in Tryptone Soy Broth (TSB; Mast Diagnostics, Merseyside, UK) agar plates for 24 h at 37°C and then in TSB for 24 h at 37°C before utilization.

**Table 1.** Bacterial strains.

Bacterial strains <sup>a</sup>	Origin (reference)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	Culture collection
<i>Bacillus</i> sp. P34 (AY962472)	<i>Leporinus</i> sp. (Motta et al., 2007)
<i>Bacillus licheniformis</i> P40 (AY962473)	<i>Leporinus</i> sp. (Cladera-Olivera et al., 2004)
<i>Bacillus</i> sp. P7 (DQ387865)	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Giongo et al., 2007)
<i>Bacillus</i> sp. P11 (DQ387864)	<i>Leporinus</i> sp. (Giongo et al., 2007)
<i>Bacillus subtilis</i> P45B (AY962474)	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Sirtori et al., 2006)

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection. Numbers within parenthesis corresponds to GenBank accession numbers.

### Genetic analysis

DNA was extracted from overnight cultures using the Promega Wizard SV Genomic DNA kit (Promega, Madison, WI, USA). Amplifications of *sboA* and *spaS* genes were carried out by PCR with specific primers, developed using the Vector NTI primer design software (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primers of *sboA-f* (5' CATCCTCGATCACAGACTTCACATG 3') and *sboA-r* (5' CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACAC 3') were used for amplifications of 734 bp *sboA* fragment, corresponding to the *Bacillus subtilis* subtilosin gene cluster (GenBank accession No. AJ430547), whereas primers of *spaS-f* (5' TGTCATGGTTACAGCGGTATCGGTC 3') and *spaS-r* (5' AGTGCAAGGAGTCAGAGCAAGGTGA 3') were employed for the 566 bp *spaS* fragment, corresponding to the *B. subtilis* subtilin gene cluster (GenBank accession No. U09819). PCR was conducted using a Mastercycler® Personal thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) under the following parameters: denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 30 s at 50°C (*sboA*)

or 55°C ( *spaS*), and elongation for 1 min at 72°C for a total of 35 cycles for both subtilisin A and subtilin.

### **Sequencing methods**

PCR products were sequenced in the ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems). The BLAST algorithm was used to retrieve for homologous sequences in GenBank (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) using the software CLUSTAL W, version 1.8 (Thompson et al. 1994).

### **Isolation of antimicrobial peptides and mass spectrometry**

The isolation of antimicrobial peptides was performed as described by Kawulka et al. (2004). Samples concentrated in a vacuum centrifuge (SpeedVac SC100, Savant, USA) were dissolved in ethanol and analyzed by mass spectrometry in a MALDI-TOF mass spectrometer (Ettan MALDI-TOF ProSystem, Amersham Biosciences, Sweden) operating in reflecton mode and using a matrix of  $\alpha$ -ciano-4-hydroxycinnamic acid.

### **Results and discussion**

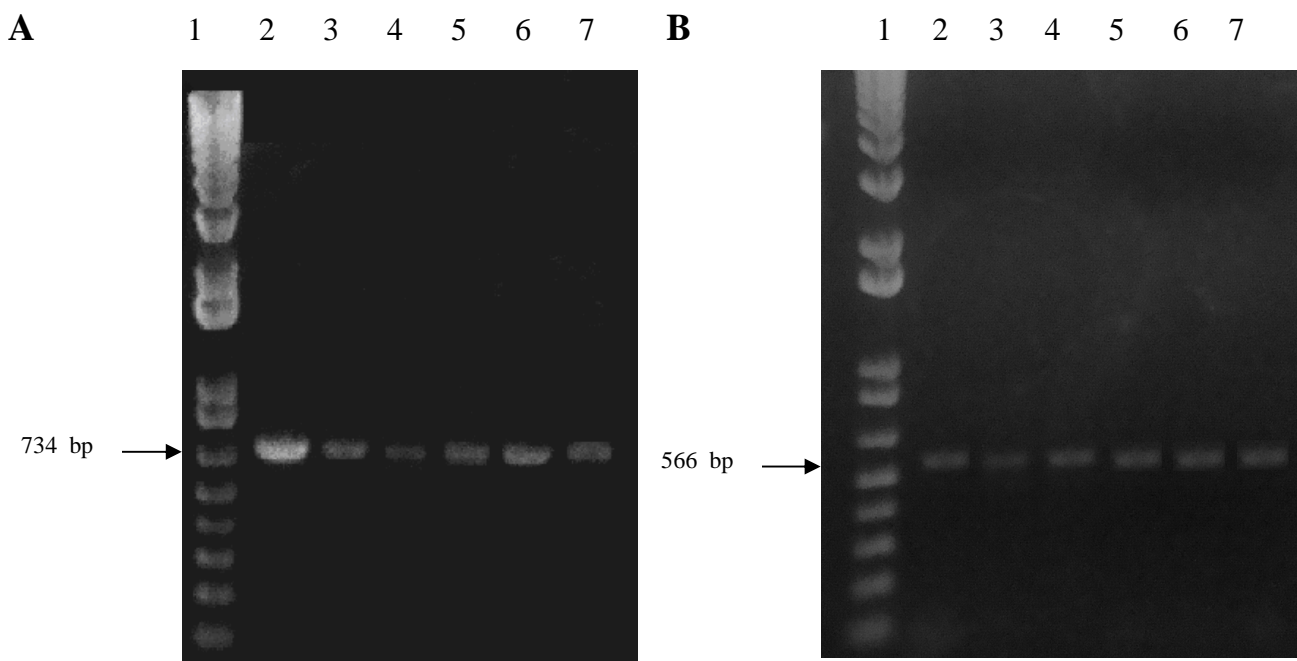
PCR analysis showed that all *Bacillus* strains isolated from aquatic environments of Brazilian Amazon basin exhibited a 734 bp fragment, potential for the gene *sboA* and a 566 bp fragment, potential for the gene *spaS* (Fig. 1).

The fragments obtained by PCRs were sequenced. All sequences of 734 bp fragments showed elevated homologies (minimum identity 98%) with the gene encoding presubtilosin (*sboA*). Similarly, the sequences of 566 bp fragments had high homologies (minimum identity 97%) with the gene encoding presubtilin (*spaS*), which corresponded to silent mutations only. The selected genes *sboA* and *spaS* are critical to warrant the production of such peptides (Stein et al. 2003; Zheng et al. 1999).

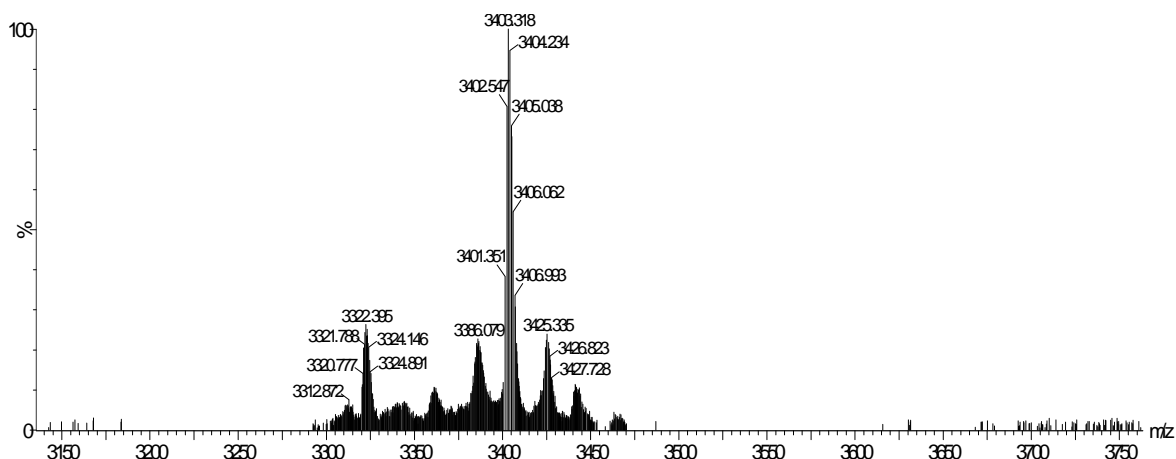
The antimicrobial peptides were isolated from the cell-free culture supernatant of *Bacillus* spp. For all samples, the mass spectra revealed clusters with major peaks at  $m/z$  3250 - 3500 Da, corresponding to subtilosin A, subtilin and isoforms of these peptides (Fig. 2). MALDI-TOF has been used for identification of antimicrobial peptides, including bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria in the mass range 3-5 kDa (Stein 2008). Peaks with similar  $m/z$  values to ericin A and ericin S were also identified for some strains. These results suggest that antimicrobial activity of these strains (Motta et al. 2004) may be associated to the production of subtilosin A and/or subtilin.

These results indicate that the technique is valuable to search for strains producing these bacteriocins among *Bacillus* spp. To sum up, this study identified novel *Bacillus* strains bearing the essential genes to produce subtilosin A and subtilin using a simple and efficient PCR method with specific primers *sboA* and *spaS* developed for this study. Previously, the presence of subtilosin A besides of *B. subtilis* was only reported to a *B. amyloliquefaciens* strain (Sutyak et al. 2008). *Bacillus* sp. P7 and P11 belongs to the cluster *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velesensis* (Giongo et al. 2007), whereas strain P34 appears to be a novel *Bacillus* species (Motta et al. 2007).

With the continuous emergence of antibiotic resistance, there has been an increased interest on bacteriocins. These peptides are considered ultimate candidates for food preservation and some clinical applications because the range of their activity is often limited and specific (Jack et al. 1995; Cotter et al. 2005). Like nisin, subtilosin A and subtilin has a proven track record of efficacy against *Listeria monocytogenes* (Stein et al. 2004; Burkard et al. 2007). This posits it as an attractive option that should be investigated by the food industry.



**Fig. 1** PCR product profiles of (A) *sboA* gene and (B) *spaS* gene. 1, Molecular weight marker; 2, *Bacillus* sp. P34; 3, *Bacillus licheniformis* P40; 4, *Bacillus* sp. P7; 5, *Bacillus* sp. P11; 6, *Bacillus subtilis* P45B; 7, *Bacillus subtilis* ATCC 19659.



**Fig. 2** Typical mass spectra of antimicrobial peptides extracted from culture supernatants of *Bacillus* spp.

### Acknowledgments

Authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

### References

- Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y, Kurahashi K (1985) Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem* 98:585-603.
- Burkard M, Entian KD, Stein T (2007) Development and application of a microtiter plate-based autoinduction bioassay for detection of the lantibiotic subtilin. *J Microbiol Methods* 70:179-185. doi: 10.1016/j.mimet.2007.04.015
- Chies JM, Dias ACO, Maia HMM, Astolfi-Filho S (2002) *BanAI* a new isoschizomer of the type II restriction endonuclease *HaeIII* discovered in a *Bacillus anthracis* isolate from Amazon basin. *FEMS Microbiology Letters* 215:97-101. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11376.x

- Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A (2004) Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol* 38:251-256. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01478.x
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature* 3:777-788. doi: 10.1038/nrmicro1273
- Giongo JL, Lucas FS, Casarin F, Heeb P, Brandelli A (2007) Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J Microbiol Biotechnol* 23:375-382. doi: 10.1007/s11274-006-9234-1
- Jack RW, Tagg FR, Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59:171–200.
- Kawulka KE, Sprules T, Diaper CM, Whittal RM, McKay RT, Mercier P, Zuber P, Vederas JC (2004) Structure of Subtilosin A, a Cyclic Antimicrobial Peptide from *Bacillus subtilis* with Unusual Sulfur to R-Carbon Cross-Links: Formation and Reduction of R-Thio-R-Amino Acid Derivatives. *Biochemistry* 43:3385-3395. doi: 10.1021/bi0359527
- Klein C, Entian KD (1994) Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl Environ Microbiol* 60:2793-2801.
- Motta AS, Cladera-Olivera F, Brandelli A (2004) Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Braz J Microbiol* 35:307–310. doi: 10.1590/S1517-83822004000300007
- Motta AS, Cannavan FS, Tsai SM, Brandelli A (2007) Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated

from Amazon basin. Arch Microbiol 188:367-375. doi: 10.1007/s00203-007-0257-2

Stein T (2008) Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. Rapid Commun Mass Spectrom 22:1146–1152. doi: 10.1002/rcm.3481

Stein T, Düsterhus S, Stroh A, Entian KD (2004) Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. Appl Environ Microbiol 70:2349-2353. doi: 10.1128/AEM.70.4.2349-2353.2004

Stein T, Heinzmann S, Kiesau P, Himmel B, Entian KD (2003) The spa-box for transcriptional activation of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 47:1627-1636. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03374.x

Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, Chikindas ML (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. J Appl Microbiol 104:1067-1074. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03626.x

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673

Zheng G, Hehin R, Zuber P (2000) Mutational Analysis of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. J Bacteriol 182:3266-3273.



Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P (1999) Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. J Bacteriol 181:7346-7355.

### 4.3 CAPÍTULO III

**Real time PCR investigation on the expression of *sboA* and *ituD* genes in *Bacillus* spp.**

Renata V. Velho, Danielle G. G. Caldas, Luis F. C. Medina, Siu M. Tsai e  
Adriano Brandelli

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Letters in Applied  
Microbiology*.

## ABSTRACT

**Aims:** To investigate the expression of *sboA* and *ituD* genes among strains of *Bacillus* spp. incubated at different pH and temperature.

**Methods and Results:** Different *Bacillus* strains of Amazon basin and *Bacillus subtilis* ATCC 19659 were investigated for production of subtilosin A and iturin A by qRT-PCR, analyzing *sboA* and *ituD* gene expression under different culture conditions. Amazonian strains presented a general gene expression level lower than *Bacillus subtilis* ATCC 19659 for *sboA*. In contrast, when analyzing the expression of *ituD* gene, the strains from Amazon, particularly P40 and P45B, exhibited higher levels of expression. Changes in pH (6 and 8) and temperature (37 and 42°C) caused a decrease of *sboA* expression, but increased *ituD* expression among strains from Amazonian environment.

**Conclusions:** Temperature and pH have an important influence on the expression of genes *sboA* (subtilosin A) and *ituD* (iturin A) among *Bacillus* spp. The strains P40 and P45B can be useful for production of the antimicrobial peptide iturin A.

**Significance and Impact of the Study:** Monitoring the expression of essential biosynthetic genes by qRT-PCR is a valuable tool for optimization of the production of antimicrobial peptides.

## INTRODUCTION

The endospore-forming bacteria from the genus *Bacillus* are able to produce several peptide antibiotics with an amazing variety of structures. Most of these components show antimicrobial or antiviral activity (Stein 2005). The biosynthesis of these peptides is known to be influenced by environmental conditions such as pH, temperature and oxygen availability (Çalik *et al.* 2000). In its natural environment, *Bacillus* is exposed to different conditions that induce modifications in its physiology and metabolism. At lower temperature, cells are confronted with several problems, including reduced enzyme activities, low membrane fluidity and decreased initiation of translation due to stabilized secondary structures of mRNAs or slower protein folding (Fickers *et al.* 2008). Authors pointed out the importance of the pH for microorganism in general and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in particular (Guez *et al.* 2008).

The production of mature subtilisin A requires the expression of eight (*sboA-albABCDEFGF*) of the nine genes identified in the operon of the *Bacillus*. These clustered genes are transcribed from a promoter residing upstream of the *sboA* structural gene and their products are involved in the posttranslational modification and processing of presubtilisin, secretion and also immunity (Zheng *et al.* 2000; Maqueda *et al.* 2008). Gene clusters involved in iturin A biosynthesis are composed of four open reading frames: *ituD*, *ituA*, *ituB*, and *ituC*. The *ituD* gene encodes a malonyl coenzyme A transacylase, whose disruption results in a specific deficiency in iturin A production. The *lpa-14* gene encodes the 4'-phosphopanthetheinyl transferase required for the maturation of the template enzyme of iturin A. Both the *ituD* gene and the *lpa-14* gene play

leading roles in the production of this bacteriocin (Tsuge *et al.* 2001; Hsieh *et al.* 2008).

Amazon basin is a source of enormous biological diversity for microorganisms with potential biotechnological value (Bastos *et al.* 2000; Chies *et al.* 2002). The screening for microorganisms producing antimicrobial peptides revealed some *Bacillus* spp. showing remarkable antimicrobial activity (Cladera-Olivera *et al.* 2004; Motta *et al.* 2004). Although the effect of environmental conditions like pH and temperature on production of antimicrobial activity has been described (Cladera-Olivera *et al.* 2004; Motta and Brandelli 2008), the influence on the expression of essential genes for the production of antimicrobial peptides such as subtilisin A (*sboA*) and iturin A (*ituD*), has not been investigated.

In this article, the expression of genes *sboA* and *ituD* was investigated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) among *Bacillus* strains of Amazon basin and *Bacillus subtilis* ATCC 19659 as a reference strain. The influence of different growth conditions such as pH and temperature on gene expression was also investigated.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains and growth conditions**

Bacterial strains used in this work included bacteria from aquatic environments of the Amazon region, near Manaus, Brazil (3°06'S, 60°01'W). They were kindly provided by Dr. Spartaco Astolfi Filho (Universidade Federal do Amazonas, Brazil) and are listed in Table 1. Bacteria were grown in 20 mL of BHI broth (Oxoid, Basingstore, UK) for 24 h, pH 7.4 at 37°C in a rotary shaker (Cientec,

Piracicaba, Brazil) at 125 rpm. These cultures were used to inoculate 200 mL of BHI broth with shaking in different conditions. In the heat shock treatment, *Bacillus* strains were incubated for 36 h at 37°C and at 42°C. To induce pH stresses, the cells were grown in BHI broth pH 6 or pH 8 for 36 h at 30°C. Control conditions were performed in BHI pH 7.4, for 36 h at 30°C. Samples were removed from these flasks for RNA extraction.

**Table 1.** Bacterial strains.

Bacterial strains <sup>a</sup>	Origin
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	Culture collection
<i>Bacillus</i> sp. P34 (AY962472)	<i>Leporinus</i> sp.
<i>Bacillus licheniformis</i> P40 (AY962473)	<i>Leporinus</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp. P7 (DQ387865)	<i>Piaractus mesopotamicus</i>
<i>Bacillus subtilis</i> P45B (AY962474)	<i>Piaractus mesopotamicus</i>

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection. Numbers within parenthesis corresponds to GenBank accession numbers.

### Total RNA extraction and cDNA synthesis

A volume corresponding to  $1 \times 10^8$  cells was sampled from the flasks of the different growth conditions and pelleted by centrifugation. The resulting cells were added to 1 mL of TRIzol Reagent (Invitrogen) and total RNA were extracted according to the manufacturer's instructions. The RNA concentrations and quality were estimated spectrophotometrically at 260 and 280 nm on a NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland,

DE). The samples also were eletrophoresed in an agarose gel 1.5% at 75V for 1 h to check their integrity.

To synthesize cDNAs from total RNA, the samples were first treated with DNase enzyme (Fermentas Life Sciences) to inactivate DNA molecules that could remain from the extraction. Then, *ituD*, *sboA* and *rpsJ* cDNAs were synthesized from 30 ng of total RNA by using SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq kit (Invitrogen). The thermal cycler conditions were 50°C for 30 min to first strand synthesis, 94°C for 2 min to inactivate the RT enzyme and activate Taq polymerase, and 10 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1 min. The primers *ituD-f* (CTCAAGCAGCACATGACGAT), *ituD-r* (ACCGGCTAAGACATTGTTTCG), *sboA-f* (GGACGGTCCTATCCCTGATT) and *sboA-r* (TGACTATGCCCTTTTGGAGAA) were designed for the requirements imposed by real-time quantitative PCR using Primer3 v. 4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

### **Quantitative real-time PCR**

The real-time PCR was carried out in a 20 µl reaction containing 1.5 µl of pre-amplified cDNA, 400 nM of primers and 10 µl of Power SYBR® Green PCR Master Mix 2 X (Applied Biosystems).

PCRs were performed in triplicate and run on the StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) under the following conditions: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s, with data collection at the last stage. To verify the specificity of the fragments, melting curves were determined for each reaction as follow: 95°C for 1 min, 60°C for 1 min with the temperature raising and data collection each 0.7 °C until

it reaches 95°C. The *rpsJ* gene (encoding ribosomal protein), expressed at a constant level under our conditions and already used as an internal standard in *Bacillus* (Jordan *et al.*, 2006), was used as reference gene to normalize the data. A non-template control also was run with the samples to check for possible mix contamination and primer dimmers. We used the program LinRegPCR version 11.0 (Ramakers *et al.*, 2003) to determine the molecular starting concentration ( $N_0$ ) and the amplification efficiencies ( $E$ ) for each reaction. After normalization to the reference gene *rpsJ*, the expression levels for each growth condition in the different strains were compared with *B. subtilis* ATCC 19659, obtaining a ratio for *ituD* and *sboA* expression level.

## RESULTS

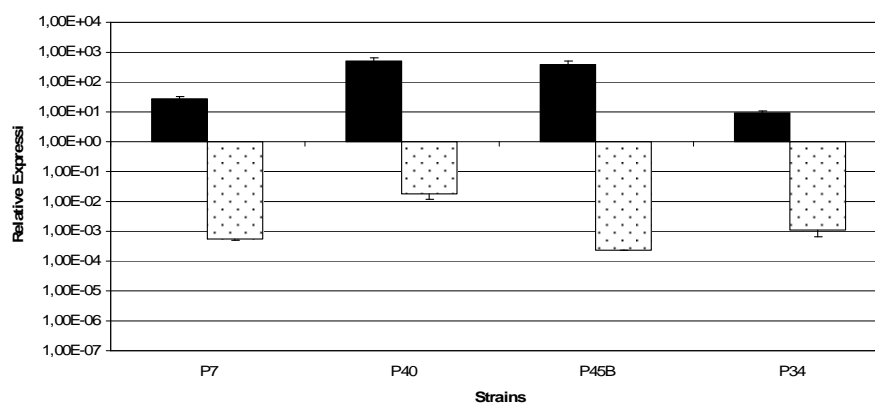
Standard conditions for analysis of *ituD* (iturin A) and *sboA* (subtilosin A) expression were performed with BHI in pH 7.4, for 36 h at 30°C. In this condition, *B. subtilis* ATCC 19659 *sboA* gene showed at least 53 times more than in the Amazonian strains. In relation to the *ituD* gene, the Amazonian strains showed a higher expression of 8 to 492 times (Figure 1). *Bacillus licheniformis* P40 showed the highest expression (485.27 times) followed by *B. subtilis* P45B (404.17 times).

To investigate the influence of temperature, incubation temperature of the bacteria was increased from 30°C to 37°C and 42°C and the samples were assessed for production of subtilosin A and iturin A transcripts (Figure 2). For *sboA* gene, *B. subtilis* ATCC 19659 again showed increased expression in both treatments of increased temperature when compared with all strains studied. However, all Amazonian strains demonstrated its superiority in relation to *ituD*

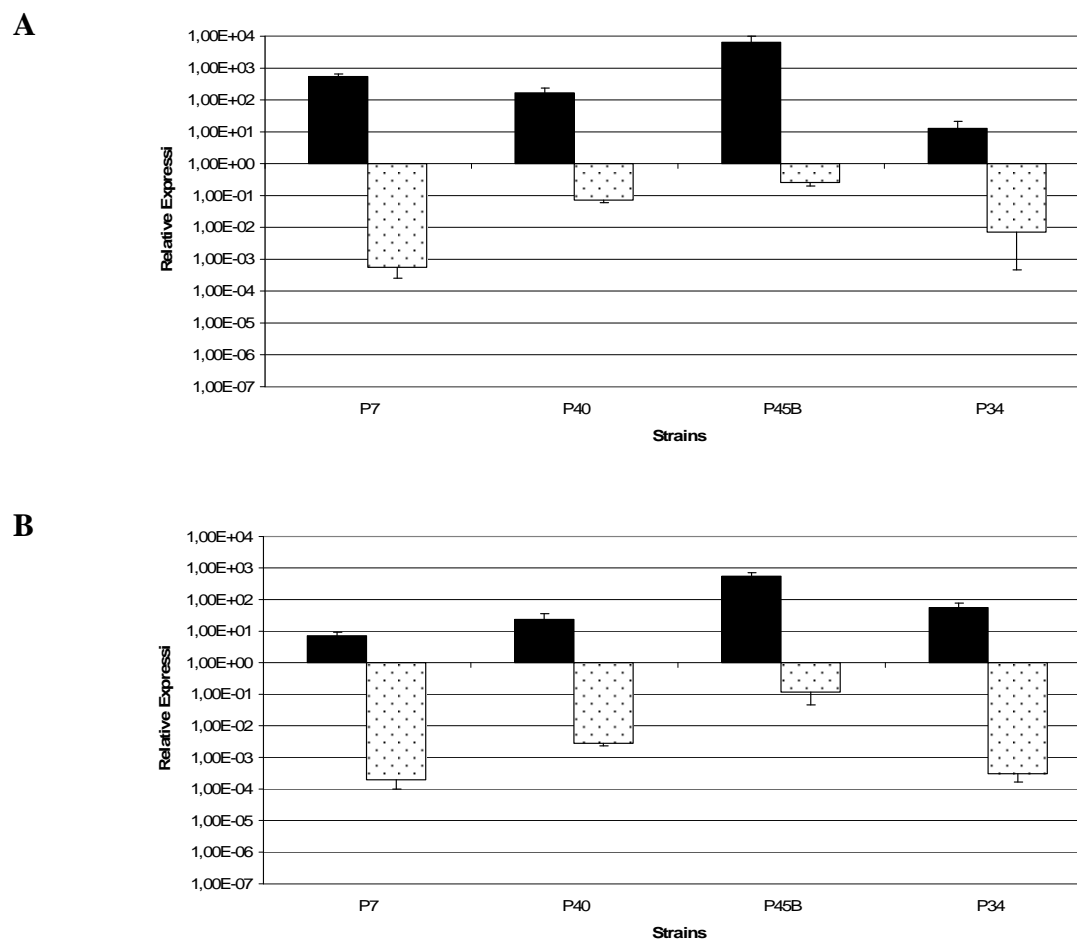


gene expression at temperatures of 37°C and 42°C. *ituD* expression level in strain P45B increased by 567 times at 42°C and 6515 times at 37°C. The temperature of 37°C stimulated the *ituD* expression in the strains P7 and P40 (542.53 and 166.96 – fold increased, respectively), also stimulated the strain P34, however, more lenient (13.2 times). The thermal shock caused by the temperature of 42°C represented the stimulus to gene expression in P34 (54.32- fold increased) and P40 (24.42 – fold increased).

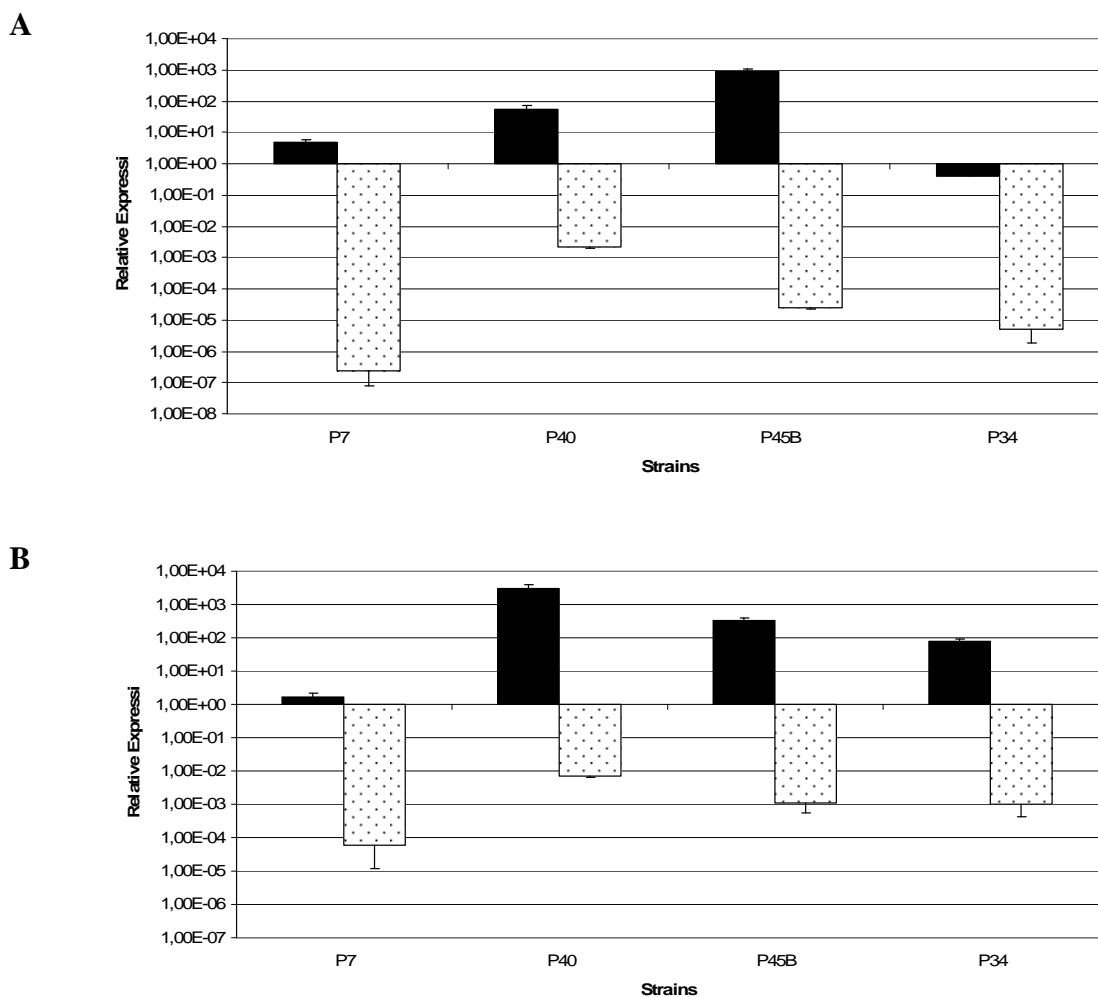
Similar to the previous conditions, changes in pH decreased *sboA* expression in all strains tested. There was a decrease from 443 to more than 4203,707 times in the expression of *sboA* in pH 6 and a decrease from 143 to 16.659 times at pH 8 (Figure 3). pH stress increased the expression of *ituD* in the Amazon strains (except for P34 in pH 6 that also had a decreased *ituD* expression of 2.55 times) but more lenient when compared to increases caused by previous treatments. The increased expression of *ituD* ranged from 4.97 to 889 times in pH 6 and 1.65 to 3038 times at pH 8. pH 6 induced the expression of the gene responsible for synthesis of iturin A in *Bacillus* sp. P45B (889.19 times). But the stress caused by alkaline pH (pH 8) induced *ituD* gene in P40 (3083), P45B (330.98), P34 (80.3 times) and uninduced in P7.



**Fig. 1.** Gene expression of *sboA* (dotted bars) and *ituD* (black bars) by *Bacillus* strains in control treatment at pH 7,4 and 30°C. Values are relative to *Bacillus subtilis* ATCC as reference strain.



**Fig. 2.** Gene expression of *sboA* (dotted bars) and *ituD* (black bars) by *Bacillus* strains at 37°C (A) and 42°C (B).



**Fig. 3.** Gene expression of *sboA* (dotted bars) and *ituD* (black bars) by *Bacillus* strains in pH 6 (A) and pH 8 (B).

## DISCUSSION

Bacteriocins produced by *Bacillus* are a heterogeneous group of antimicrobial proteins or peptides that vary in spectrum of activity, mode of action, molecular mass, biochemical properties and genetic origin (Cotter *et al.* 2005). The production of anti-bacterial peptides is a first line of defense, and also part of the innate immunity, found in a variety of species. These metabolites are often confused with antibiotics, they differentiate from antibiotics on the basis of the

mode of action, antimicrobial spectrum, toxicity and resistance mechanisms (Cotter *et al.* 2005; Arauz *et al.* 2009).

Few studies utilize qRT-PCR to investigate the effect of bacteriocins on gene expression of target cells (Ramnath *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2007; Palmer *et al.* 2009). However, this technique has not been used to study the expression of genes involved in bacteriocin synthesis. In this work, *sboA* and *ituD* expression by *B. subtilis* ATCC 19659 and four Amazon strains in different conditions were checked by qRT-PCR. The expression of both genes was observed in all conditions tested. Comparison of *sboA* and *ituD* expression in different conditions highlighted the importance of the choice of culture conditions especially if the objective is to optimize the production of a selected antimicrobial peptide.

Under the experimental conditions of this study, Amazonian strains presented a general level of gene expression lower than *B. subtilis* ATCC 19659 for *sboA*. In contrast, when analyzing the expression levels of *ituD* gene, the strains isolated from aquatic environment of the Amazon exhibited higher levels of expression.

The *sbo-alb* operon is known to be under complex control (Zheng *et al.* 2000; Nakano *et al.*, 2000). This operon is induced in late growth cultures apparently in response to starvation and is also dramatically induced by oxygen limitation (Zheng *et al.* 2000; Nakano *et al.* 2000). Many of the factors governing gene expression in response to starvation (Grossman 1995; Msadek 1999) and oxygen limitation (Nakano *et al.* 1996; Sun *et al.* 1996; Nakano and Zuber 1998) have been identified in *B. subtilis*. Transcription of the *sboA-alb* operon is strongly induced by oxygen limitation via the ResD-ResE signal transduction

system, which plays a pivotal role in anaerobic respiration (Inaoka *et al.* 2003). In addition, the transition state regulator AbrB represses *sboA-alb* transcription independently from the ResD-ResE pathway (Inaoka *et al.* 2003). Furthermore, Rok, which is known to be a regulator of competence development, represses *sboA-alb* transcription (Allenby *et al.* 2006). It is not known how these multiple regulatory factors reflect upon the physiological roles of subtilisin A and the *alb* genes, but it is known that stress conditions induce the expression of this operon (Nakano *et al.* 2000; Albano *et al.* 2005; Strauch *et al.* 2007).

While the chemical principles for the biosynthesis of iturin A are largely known (Duitman *et al.* 1999; Tsuge *et al.* 2001; Hsieh *et al.* 2008), information on the regulatory mechanisms that control the synthesis of cyclic lipopeptides in *Bacillus* is restricted (Duitman *et al.* 2007; Koumotsi *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009). Some evidence has shown that DegQ controls the transcription of peptide antibiotics and not a subsequent step in their production. DegQ is a small pleiotropic regulatory protein that controls the expression of degradative enzymes, intracellular proteases, and several other secreted enzymes (Amory *et al.* 1987; Msadek *et al.*, 1991). Although the direct interaction between DegQ/DegU and the iturin promoter has not been investigated, it is very likely that expression of the giant gene clusters governing synthesis of iturin-like compounds in bacilli (Duitman *et al.* 1999; Tsuge *et al.* 2001; Hofemeister *et al.* 2004) are controlled by the same transcriptional regulator than bacillomycin D (Koumotsi *et al.* 2007). Synthesis of bacillomycin D in *B. amyloliquefaciens* FZB42 is driven by a stationary-phase-induced  $\sigma^A$  promoter. Three global regulators, DegU, DegQ, ComA and the minor sigma factors  $\sigma^B$  and  $\sigma^H$  that positively influence the transcriptional activation of the *bmy* promoter ( $P_{bmy}$ )

have been identified. Direct control on  $P_{bmy}$  is exerted by DegU, which occupies two distinct sites at the *bmy* promoter (Koumotsi *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009). In contrast ComA controls *bmy* expression indirectly via DegQ, which serves as an auxiliary factor to DegU. ComA is a regulator of late competence genes (Guillen *et al.* 1989) and surfactin production (Roggiani and Dubnau 1993; Shimane and Ogura 2004).

In spite of the regulatory control exercised over the operons of iturin A and subtilosin A under different growth conditions, Amazonian *Bacillus* strains have basal levels of expression of these operons different from each other and in relation to *B. subtilis* ATCC 19659. Thus, it appears that the strains of *Bacillus* isolated in the Amazon have higher levels of expression of *ituD* and lower of *sboA* when compared to *B. subtilis* ATCC 19659.

Iturin A shows strong antibiotic activity against a broad spectrum of fungi, making it a potential agent for biological control with the aim of reducing the use of chemical pesticides in agriculture (Sandrin *et al.* 1990; Maget-Dana and Peypoux 1994). Iturins are molecules of a heptapeptide linked to a  $\beta$ -amino fatty acid. In fact, the antifungal activity of *B. subtilis* can be attributed, to a certain extent, to its production of iturin A (Tsuge *et al.* 2001). Strains P40 and P45B showed the highest levels of *ituD* expression compared with other Amazon strains and *B. subtilis* ATCC 19659. These results confirm the data previously obtained through experiments where the antifungal activity of strains P40, P34 and arguably, *Bacillus* sp. P45B showed the largest zones of growth inhibition of pathogenic fungi tested, including *Fusarium graminearum f. lycopersici* is considered the most sensitive to screening iturin A producing strains (Hsieh *et al.* 2008). Based on these data, it is believed that the strains P40 and P45B can

be used in the agricultural industry for the production of bacteriocin iturin A more effectively than *B. subtilis* ATCC 19659.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support of CNPq and CAPES (Brazil).

## REFERENCES

- Albano, M., Smits, W.K., Ho, L.T.Y., Kraigher, B., Mandic-Mulec, I., Kuipers, O.P. and Dubnau, D. (2005) The Rok protein of *Bacillus subtilis* represses genes for cell surface and extracellular functions. *J Bacteriol* **187**, 2010-2019.
- Allenby, N.E., Watts, C.A., Homuth, G., Pragai, Z., Wipat, A., Ward, A.C. and Harwood, C.R. (2006) Phosphate starvation induces the sporulation killing factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 5299-5303.
- Amory, A., Kunst, F., Aubert, E., Klier, A. and Rapoport, G. (1987) Characterization of the *sacQ* genes from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**, 324-333.
- Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., Penna, T.C.V. (2009) Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends Food Sci Technol* **20**, 146-154.
- Bastos, A.E.R., Moon, D.H, Rossi, A., Trevors, J.T. and Tsai, S.M. (2000) Salt-tolerant phenoldegrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Arch. Microbiol* **174**, 346-352.
- Borneman, J. and Triplett, E.W. (1997) Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence of unusual microorganisms and microbial population shifts with deforestation. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2647-2653.

- Çalik, P., Çalik, G. and Özdamar, T.H. (2000) Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Bioeng* **69**, 301-311.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., Piel, J. and Borriss, R. (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* **140**, 27-37.
- Chies, J.M., Dias, A.C.O., Maia, H.M.M. and Astolfi-Filho, S. (2002) BanAI a new isoschizomer of type II restriction endonuclease HaeIII discovered in *Bacillus anthracis* isolate from Amazon basin. *FEMS Microbiol Lett* **215**, 95-101.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R. and Brandelli A. (2004) Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol* **38**, 251-256.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev Microbiol* **3**, 777-788.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F. and Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13294-13299.
- Duitman, E.H., Wyczawski, D., Boven, L.G., Venema, G., Kuipers, O.P. and Hamoen, L.W. (2007) Novel methods for genetic transformation of natural



- Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3490-3496.
- Fickers, P., Leclère, V., Guez, J.S., Béchet, M., Coucheney, F., Joris, B. and Jacques, P. (2008) Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Res Microbiol* **159**, 449-457.
- Grossman, A.D. (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **29**, 477-508.
- Guez, J.S., Müller, C.H., Danze, P.M., Büchs, J. and Jacques, P. (2008) Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *J Biotech* **134**, 121-126.
- Guillen, N., Weinrauch, Y. and Dubnau, D.A. (1989) Cloning and characterization of the regulatory *Bacillus subtilis* competence genes *comA* and *comB*. *J Bacteriol* **171**, 5354-5361.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Leenders, F., Hitzeroth, G. and Vater, J. (2004) Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol Genet Genomics* **272**, 363-378.
- Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M. and Kao, S.S. (2008) Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr Microbiol* **56**, 1-5.

- Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M. and Ochi, K. (2003) Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **278**, 2169-2176.
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J.D. and Mascher, T. (2006) Regulation of LiaRS-Dependent Gene Expression in *Bacillus subtilis*: Identification of Inhibitor Proteins, Regulator Binding Sites, and Target Genes of a Conserved Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System. *J Bacteriol* **188**, 5153-5166.
- Koumoutsi, A., Chen, X.H., Vater, J. and Borriss, R. (2007) DegU and YczE Positively Regulate the Synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6953-6964.
- Maget-Dana, R. and Peypoux, F. (1994) Iturins, a special class of poreforming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**, 151-174.
- Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E. and Martínez-Bueno, M. (2008) Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 2-22.
- Martínez, B., Zomer, A.L., Rodríguez, A., Kok, J. and Kuipers, O.P. (2007) Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the lactococcal two-component system CesSR. *Mol Microbiol* **64**, 473-486.
- Motta, A.S. and Brandelli, A. (2008) Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 641-646.

- Motta, A.S., Cladera-Olivera, F. and Brandelli, A. (2004) Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Brazil J Microbiol* **35**, 307-310.
- Msadek, T. (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* **7**, 201-207.
- Msadek, T., Kunst, F., Klier, A. and Rapoport, G. (1991) DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *J Bacteriol* **173**, 2366-2377.
- Nakano, M.M., Zheng G. and Zuber, P. (2000) Dual control of *sbo-alb* operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**, 3274-3277.
- Nakano, M.M. and Zuber, P. (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe." *Annu Rev Microbiol* **52**, 165-190.
- Nakano, M.M., Zuber, P., Glaser, P., Danchin, A. and Hulett, F.M. (1996) Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 3796-3802.
- Palmer, M.E., Wiedmann, M. and Boor, K.J. (2009)  $\sigma^B$  and  $\sigma^L$  Contribute to *Listeria monocytogenes* 10403S response to the antimicrobial peptides SdpC and nisin. *Foodborne Path Dis* **6**, 1057-1065.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H. and Moorman, A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**, 62-66.

- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W., Héchard, Y. (2004) Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiol* **150**, 2663-2668.
- Roggiani, M. and Dubnau, D. (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J Bacteriol* **175**, 3182-3187.
- Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. (1990) Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem* **12**, 370-375.
- Shimane, K. and Ogura, M. (2004) Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. *J Biochem* **136**, 387-397.
- Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**, 845-857.
- Strauch, M.A., Bobay, B.G., Cavanagh, J., Yao, F., Wilson, A. and Le Breton, Y. (2007) Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression. *J Bacteriol* **189**, 7720-7732.
- Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M.F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S.D. and Hulett, F.M. (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 1374-1385.
- Tsuge, K., Akiyama, T. and Shoda, M. (2001) Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol* **183**, 6265-6273.

Zheng, G., Hehn, R. and Zuber, P. (2000) Mutational analysis of *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. *J Bacteriol* **182**, 3266-3273.

## 4.4 CAPÍTULO IV

### Análise dos dados de qRT-PCR

Os dados de qRT-PCR também foram analisados com o objetivo de otimizar a expressão dos genes *sboA* e *ituD* nas linhagens de *Bacillus* de ambiente aquático da Amazônia avaliando o efeito das variáveis temperatura e pH inicial.

Após a normalização do gene de referência, *rpsJ*, os níveis de expressão de cada isolado nas diferentes condições de cultivo foram comparados com os níveis obtidos em sua condição controle, obtendo-se uma relação dos níveis de expressão de *sboA* e *ituD*.

### Resultados e Discussão

#### Efeito do pH e temperatura na expressão dos genes *sboA* e *ituD*

O efeito do pH e da temperatura são muito importantes para a produção de bacteriocinas e tem sido reportado para diferentes peptídeos antimicrobianos de *Lactobacillus* (AASEN *et al.*, 2000; ZALÁN *et al.*, 2005) e *Bacillus* (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004; MOTTA & BRANDELLI, 2008; ANTHONY *et al.*, 2009). Utilizando a metodologia de qRT-PCR, é demonstrado como estes parâmetros atuam sobre a expressão dos genes *sboA* e *ituD* em linhagens de *Bacillus* isolados de ambiente aquático da Amazônia.

Os resultados de choque térmico e estresse causado pelo pH sobre a expressão de *sboA* são apresentados na Fig. 1. O estresse das

temperaturas de 37°C e 42°C induziram a expressão do gene *sboA* somente no isolado P45B (70.99 e 44.30 vezes, respectivamente) enquanto que para as outras linhagens, a expressão foi suprimida. Em relação ao pH, as linhagens de *Bacillus* responderam de forma diferenciada. *Bacillus* sp. P7 teve a expressão do gene que codifica a pré-subtilosina A reprimida sobre o pH 6 (8.55 vezes) e ativada em pH 8 (6.13); *sboA* em P40, P45B e P34 foi induzido pelo estresse causado por ambos os pHs.

O efeito do choque térmico na expressão de *ituD* é mostrado na Fig. 1. A temperatura de 37°C estimulou a expressão deste gene nas linhagens P7 e P45B (16.48 e 20.71, respectivamente), também induziu a expressão no isolado P34, entretando, de forma mais branda (1.44 vezes). 42°C representou um estímulo para a expressão de *ituD* em P34 (23.21) e P45B (3.23 vezes). As quatro linhagens isoladas de ambiente aquático da Amazônia foram também expostas a condição de estresse causado pelo pH (Fig. A). pH 6 induziu a expressão do gene responsável pela síntese de iturina A em *Bacillus* sp. P45B (14.16 vezes). Contudo, o estresse causado pelo pH alcalino (pH 8) estimulou a expressão do gene *ituD* em P40 (3.52), P34 (5.18) e reprimiu em P7 e P45B.

Estudos utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimizar a produção de bacteriocinas das linhagens *Bacillus licheniformis* P40 e *Bacillus* sp. P34 mostraram alguns dados discrepantes em relação aos obtidos por este trabalho. A produção máxima de bacteriocinas para P40 foi obtida em pH entre 6.5 e 7.5 (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004), faixa intermediária a testada por qRT-PCR. Os resultados obtidos pela metodologia de PCR em tempo real, mostram que o pH ótimo para a expressão de *sboA* é pH 6 (32.12 vezes) e pH 8 (3.52) para o gene *ituD*. Em relação à temperatura,

onde a otimização por RSM ocorreu entre 26°C e 37°C (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004), os dados não foram discrepantes, considerando que a 37°C, a expressão foi suprimida em apenas 1,33 vezes em relação a temperatura de 30°C ( condição controle) para *sboA* e 3,29 vezes para *ituD*.

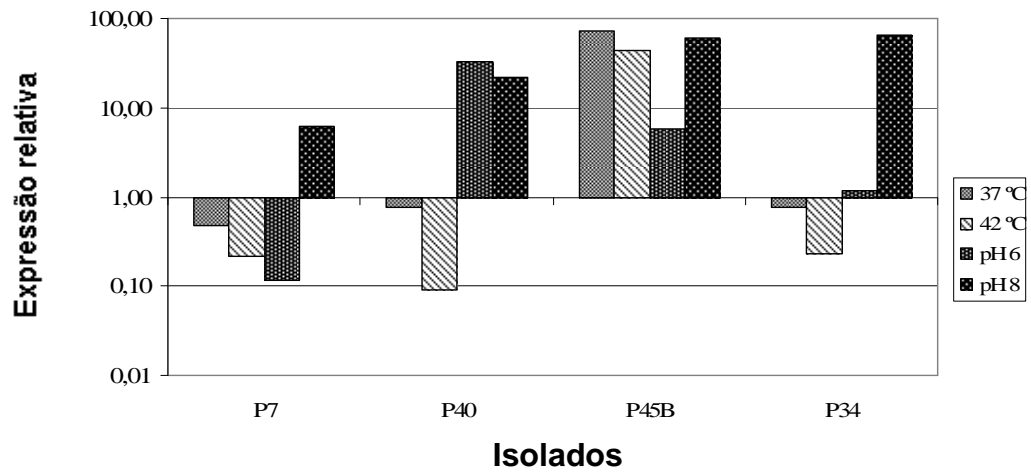
Para *Bacillus* sp. P34, a máxima produção de bacteriocinas foi observada na faixa de pH 6 a 8 e temperaturas entre 25°C e 37°C utilizando-se RSM (MOTTA & BRANDELLI, 2008). Através de qRT-PCR, o pH ótimo foi o pH 8 para os genes *sboA* e *ituD* (64,31 e 5,18 vezes, respectivamente) e a temperatura de 30°C (condição controle) para o gene que codifica a pré-subtilosina A e 42°C (23,21) para o gene responsável pela produção competente da iturina A.

As diferenças dos dados obtidos por RSM e qRT-PCR podem estar relacionadas ao fato de que Cladera-Olivera *et al.* (2004) e Motta & Brandelli (2008) objetivaram otimizar a produção de bacteriocinas sintetizadas pelos isolados P40 e P34, ao invés de RNAm de subtilosina A e iturina A, especificamente.

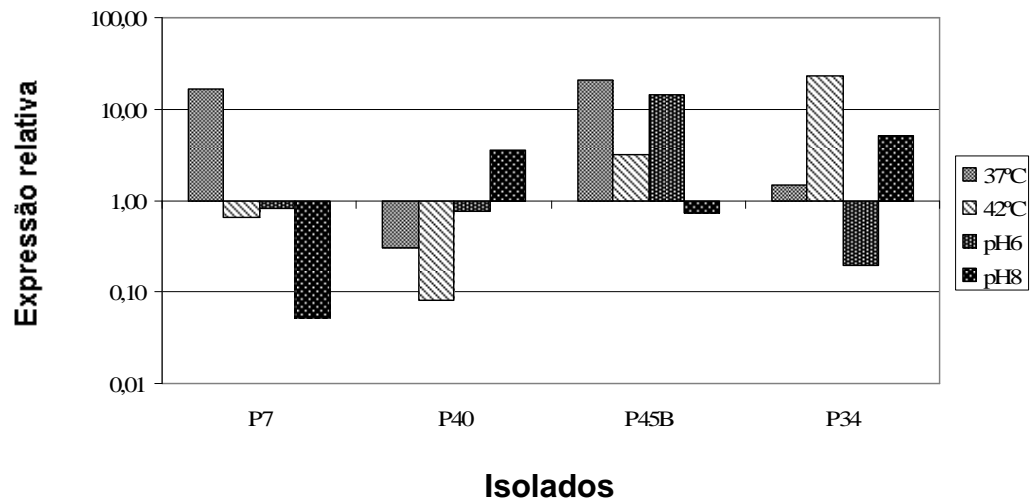
Desta forma, conclui-se que as condições adversas, como altas temperaturas e variações no pH inicial do meio de cultura são importantes parâmetros quando o objetivo é avaliar a produção de uma bacteriocina em isolados de *Bacillus*. Os resultados mostram que a produção de subtilosina A e iturina A pode ser fortemente afetada por fatores ambientais e qRT-PCR provou ser uma poderosa ferramenta para otimizar a produção destas bacteriocinas por linhagens de *Bacillus* isoladas de ambiente aquático da Amazônia.



A



B



**Fig. 1.** Avaliação da expressão de *sboA* (A) e *ituD* (B) após tratamento de estresse causado por pH inicial e temperatura nos isolados de *Bacillus* de ambiente aquático da Amazônia

## 5 DISCUSSÃO GERAL

A multiplicidade físico-química dos ambientes desafiou a natureza a desenvolver numerosas adaptações moleculares. Ao estudar a diversidade de micro-organismos, há sempre a chance de se encontrar bactérias que produzam proteínas com melhores propriedades e adequadas para a exploração comercial. Desta forma, a diversidade bacteriana é um importante recurso para processos e produtos biotecnológicos (GUPTA *et al.*, 2002).

Apesar dos trabalhos realizados quanto à biodiversidade da Amazônia, poucos estudos são desenvolvidos com o objetivo de investigar a complexidade genética e o potencial biotecnológico desta região, principalmente quando se trata de micro-organismos. Motta *et al.* (2004) investigaram a atividade antimicrobiana de bactérias isoladas de ambiente aquático da Amazônia. Dos 86 isolados testados, 59 apresentaram atividade bactericida e/ ou bacteriostática contra pelo menos uma bactéria indicadora. As cinco linhagens que demonstraram produzir substâncias com maior atividade inibitória foram selecionadas para esta pesquisa.

Os cinco isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, amplamente distribuído e investigado pela capacidade de produção de metabólitos de interesse biotecnológico como enzimas e bacteriocinas (STEIN, 2005; SIRTORI *et al.*, 2006; GIONGO *et al.*, 2007; MOTTA *et al.*, 2007). Os micro-organismos *Bacillus* sp. P11, *Bacillus* sp. P34 e *Bacillus subtilis* P40 foram isolados do intestino do peixe Piau-com-pinta (*Leporinus* sp. - Anostomidae). *Bacillus subtilis* P45B e *Bacillus* sp. P7 foram

obtidos do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus* - Characidae). Outras substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias intestinais de peixe têm sido descritas, por exemplo, as produzidas por *Carnobacterium divergens* V41, *Carnobacterium piscicola* (PILLET *et al.*, 1995), pelo *Vibrio* sp. NM10 (SUGITA *et al.*, 1997) e por *Bacillus* sp. NM12 (SUGITA *et al.*, 1998) foram postuladas como tendo função protetora no controle da contaminação intestinal por patógenos invasores.

Com o objetivo de verificar a presença de genes que codificam a produção de bacteriocinas, quatro substâncias antimicrobianas foram escolhidas para serem analisadas. Subtilosina A (BABASAKI *et al.*, 1985; ZHENG *et al.*, 2000; MAQUEDA *et al.*, 2008), subtilina (BANERJEE & HANSEN, 1988 ; KLEIN & ENTIAN, 1994; STEIN *et al.*, 2003), iturina A (KUNST *et al.*, 1997; TSUGE *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2003) e surfactina foram selecionadas por serem bacteriocinas bem conhecidas e caracterizadas (NAKANO *et al.*, 1992; PEYPOUX *et al.*, 1999; HSEIH *et al.*, 2004).

As Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas e avaliadas usando *primers* específicos para os genes das bacteriocinas subtilina, subtilosina A, iturina A e surfactina. Análises dos PCRs mostraram que as cinco linhagens testadas apresentam o gene funcional codificante de malonil Coa transacilase (*ituD*), para o gene codificador da pré-subtilosina A (*sboA*) e para o gene codificador da pré-subtilina (*spaS*). Quatro isolados, exceto *Bacillus* sp. P34, possuem potencial também para o suposto gene terminador transcricional (*sfp*). Os produtos dos PCRs foram confirmados por sequenciamento e analisados por similaridade e identidade com sequências dos genes já descritos pela literatura.

A inibição no crescimento dos fungos fitopatogênicos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum f. lycopersici* e *Fusarium graminearum* caracteriza a atividade antimicótica dos isolados de ambiente aquático da Amazônia. A produção de iturina A é um importante fator que confere atividade antifúngica às linhagens de *Bacillus* (LATOUD *et al.*, 1987; HSIEH *et al.*, 2008) e *Fusarium oxysporum f. lycopersici* é considerado o fungo mais sensível para selecionar micro-organismos produtores desta bacteriocina (HSIEH *et al.*, 2008). Compostos antimicrobianos de origem natural despertam particular interesse como agentes no biocontrole de pragas de plantas por não agredirem o meio ambiente. Estudos que utilizam micro-organismos produtores de bacteriocinas ou preparações a base dessas substâncias vêm sendo realizados como uma alternativa em potencial para o controle de enfermidades e promoção do crescimento de vegetais (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2007; TRIAS *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009).

Atividade biosurfactante em placas com ágar sangue (HSIEH *et al.*, 2004) e atividade emulsificante frente a hidrocarbonetos são importantes características de um surfactante (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2008). As linhagens de *Bacillus* isoladas de ambiente aquático da Amazônia apresentaram zonas de hemólise ao redor de cada colônia e atividade emulsificante. Entretanto, *Bacillus* sp. P34 apresentou resultado negativo no PCR para o gene *sfp*. Isto pode ser explicado pela produção de outro lipopeptídeo verificado por MALDI-TOF numa faixa de 1450-1500 Da, e/ou presença de algum composto hemolítico nesta linhagem.

MALDI-TOF mostra-se uma eficiente ferramenta para identificação de peptídeos antimicrobianos numa faixa de 1 a 5 kDa (STEIN, 2008). As análises por espectrometria de massa dos peptídeos de *Bacillus* spp. indicaram picos característicos para isoformas de surfactina, incluindo íons  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ . Picos entre 1042-1095 m/z correspondem a isoformas de iturina A descritos para *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 (HIRADATE *et al.*, 2002) e *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 (CALDEIRA *et al.*, 2008). Outros picos com valores m/z similares a bacilomicina F foram também identificados para algumas linhagens. Para todas as linhagens, o espectro revelou um *cluster* com picos entre 2950-3500 m/z, correspondendo a subtilosina A, subtilina e isoformas destes peptídeos (STEIN, 2008). Picos com valores m/z similares aos descritos para ericina A e ericina S foram também identificados em alguns isolados. Estes resultados sugerem que a atividade antifúngica destas linhagens está associada aos lipopeptídeos iturina e/ou surfactina, além de fengicinas verificadas nas linhagens P7 e P34 e que a atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (MOTTA *et al.*, 2004) pode estar associada a produção de subtilosina A e/ou subtilina.

A metodologia de qRT-PCR foi empregada para quantificar a expressão dos genes *ituD* e *sboA* em diferentes condições de crescimento bem como, realizar uma comparação entre os *Bacillus* isolados de ambiente aquático da Amazônia e *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Ao comparar as linhagens de *Bacillus* Amazônicos com *B. subtilis* ATCC 19659 em relação ao nível de expressão de *sboA* e *ituD*, observou-se, de forma geral, um nível de expressão de *sboA* pelos isolados Amazônicos inferior a *B. subtilis* ATCC

19659. Em contraste, quando os níveis de *ituD* foram avaliados, percebeu-se que as linhagens Amazônicas exibiram altos níveis de expressão deste gene.

A alteração da temperatura para 37 e 42°C induziu a expressão do gene *sboA* no isolado P45B enquanto que, para as outras linhagens Amazônicas, a expressão foi suprimida. Já em relação ao pH, os isolados de *Bacillus* responderam diferencialmente. *Bacillus* sp. P7 apresentou expressão suprimida de *sboA* sob pH 6 e induzida sob pH 8. As demais linhagens, P40, P45B e P34 aumentaram a expressão do gene da pré- subtilosina A quando submetidos ao estresse causado pelo pH. Para otimização de iturina A, a temperatura de 37°C induziu a expressão nas linhagens P7, P45B e P34. A temperatura de 42 °C representou um estímulo para a expressão do gene em P34 e P45B. O estresse causado pelo pH 6 induziu o gene responsável pela síntese da iturina A em *Bacillus subtilis* P45B. Já o pH alcalino (pH 8), induziu *ituD* em P40, P34 e suprimiu em P7 e P45B.

Estudos utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM) para a otimização da produção de bacteriocinas por *Bacillus subtilis* P40 e *Bacillus* sp. P34 mostraram alguns resultados discrepantes em relação aos dados deste trabalho. A máxima produção de bacteriocina por P40 foi verificada entre os pHs 6,5 e 7,5 (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004), faixa intermediária testada por qRT-PCR. Os resultados mostraram que o pH ótimo para indução da expressão de *sboA* é pH 6 e para *ituD*, pH 8. Em relação à temperatura, a otimização realizada por RSM para *B. subtilis* P40 ocorreu entre 26 e 37°C (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004), estes dados não foram discrepantes considerando que para *sboA* e *ituD*, a expressão máxima foi verificada a 30°C (condição controle).

Para *Bacillus* sp. P34, usando RSM, a máxima produção de bacteriocina foi obtida entre os pHs 6 a 8 e temperatura entre 25 e 37°C (MOTTA & BRANDELLI, 2008). Estes dados são confirmados para a expressão de subtilosina A, onde o pH 8 e a temperatura de 30°C foram verificados como ótimos. Já em relação à *ituD*, nesta linhagem, a otimização foi percebida em pH 8 e temperatura de 42°C.

As diferenças relatadas podem ser relacionadas ao fato de que Cladera-Olivera *et al.* (2004) e Motta & Brandelli (2008) objetivaram otimizar a produção de bacteriocinas sintetizadas pelos isolados P40 e P34, e não a expressão do gene *sboA* ou *ituD*. Outro fator relevante é o meio de cultura utilizado nos experimentos de Cladera-Olivera *et al.* (2004) que utilizou soro de queijo em pó a 7%.

O efeito do pH inicial e da temperatura são muito importantes para a produção de bacteriocinas e isto tem sido relatado para diferentes substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus* (AASEN *et al.*, 2000; ZALÁN *et al.*, 2005) e *Bacillus* (CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004; MOTTA & BRANDELLI, 2008; ANTHONY *et al.*, 2009; KHALIL *et al.*, 2009). Os resultados obtidos por este trabalho demonstram que a expressão e, conseqüentemente, a produção de subtilosina A e iturina A são afetadas por fatores ambientais. Independente do controle regulatório a que estão subordinados os operons de iturina A e subtilosina A nas condições de estresse utilizadas por este estudo, acredita-se que os *Bacillus* isolados de ambiente aquático da Amazônia possuem um nível basal de expressão diferenciado entre si e em relação à *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Desta forma, os níveis superiores de expressão

de *ituD* e inferiores de *sboA* por parte das linhagens Amazônicas quando comparadas ao *B. subtilis* ATCC 19659, poderiam ser explicados.

Apesar do conhecimento limitado sobre a genética e as relações evolutivas dos micro-organismos produtores de bacteriocinas e destas substâncias, muitos estudos vêm sendo feitos para sua utilização como bioconservantes em alimentos, biocontrole de patógenos agrícolas e antimicrobianos alternativos em saúde humana e animal. Porém, promover a aplicação destas bactérias e de seus produtos com um conhecimento genético e molecular mais aprofundado permite obter resultados mais confiáveis e seguros.



## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 CONCLUSÃO GERAL

Com este estudo, conclui-se que as linhagens de *Bacillus* isolados de intestino de peixes da Amazônia apresentam os genes e potencial para produção das bacteriocinas subtilosina A, subtilina, iturina A e surfactina.

### 6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- ✓ A PCR demonstrou ser uma importante metodologia para a triagem de linhagens de *Bacillus* com potencial para produção de bacteriocinas.
- ✓ A inibição dos fungos fitopatogênicos e a atividade hemolítica podem ser associadas à produção de bacteriocinas.
- ✓ Através do MALDI-TOF, verificou-se a produção das substâncias antimicrobianas em questão além de bacilomicina F, de fengicinas e ericinas.
- ✓ Verifica-se que os *Bacillus* isolados de intestino de peixe da Região Amazônica possuem um nível basal de expressão diferenciado entre si e em relação à *Bacillus subtilis* ATCC 19659.
- ✓ Condições ambientais como pH e temperatura influenciam a expressão de *sboA* e *ituD* nas linhagens de *Bacillus*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASEN IM, MORETRO T, KATLA T, AXELSSON L, STORRO L. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 159-166, 2000.

ABDEL-MAWGOUD AM, ABOULWABA MM, HASSOUNA NAH. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150: 289-303, 2008.

ABRIOUEL H, MAQUEDA M, GÁLVEZ A, MARTÍNEZ-BUENO M, VALDIVIA E. Inhibition of Bacterial Growth, Enterotoxin Production, and Spore Outgrowth in Strains of *Bacillus cereus* by Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1473-1477, 2002.

ALBANO M, SMITS WK, HO LTY, KRAIGHER B, MANDIC-MULEC I, KUIPERS OP, DUBNAU D. The Rok Protein of *Bacillus subtilis* Represses Genes for Cell Surface and Extracellular Functions. *Journal of Bacteriology*, 187(6): 2010-2019, 2005.

ALLENBY NE, WATTS CA, HOMUTH G, PRAGAI Z, WIPAT A, WARD AC, HARWOOD CR. Phosphate starvation induces the sporulation killing factor of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188: 5299–5303, 2006.

ALTENA K, GUDER A, CRAMER C, BIERBAUM G. Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a Type B Lantibiotic Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6): 2565-2571, 2000.

ANTHONY T, RAJESH T, KAYALVIZHI N, GUNASEKARAN P. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, 100: 872–877, 2009.

ARAUZ LJ, JOZALA AF, MAZZOLA PG, PENNA TCV. Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 146-154, 2009.

ARIMA K, KAKINUMA A, TAMURA G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31: 488–494, 1968.

ARREBOLA E, JAVOBS R, KORSTEN L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 386-395, 2010.

BABASAKI K, TAKAO T, SHIMONISHI Y, KURAHASHI K. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *Journal of Biochemistry*, 98(3): 585–603, 1985.

BANERJEE S, HANSEN JN. Structure and Expression of a Gene Encoding the Precursor of Subtilin, a Small Protein Antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(19): 9508-9514, 1988.

BIZANI D, MOTTA AS, MORRISSY JAC, TERRA RMS, SOUTO AA, BRANDELLI A. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8: 125-131, 2005.

BONGERS RS, VEENING J-W, WIERINGEN MV, KUIPERS OP, KLEEREBEZEM M. Development and Characterization of a Subtilin-Regulated Expression System in *Bacillus subtilis*: Strict Control of Gene Expression by Addition of Subtilin. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 8818–8824, 2005.

BREUKINK E, WIEDEMANN I, VAN KRAAIJ C, KUIPERS OP, SAHL H-G, KRUIJFF B. Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. *Science*, 286: 2361, 1999.

BROWN SP, INGLIS RF, TADDEI F. Evolutionary ecology of microbial wars: within-host competition and (incidental) virulence. *Evolutionary Applications*, 2(1): 32-39, 2009.

BURKARD M, ENTIAN K-D, STEIN T. Development and application of a microtiter plate-based autoinduction bioassay for detection of the lantibiotic subtilin. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 179–185, 2007.

CALDEIRA AT, FEIO SS, ARTEIRO JMS, COELHO AV, ROSEIRO JC. Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 808-816, 2008.

CARRILLO C, TERUEL JA, ARANDA FJ, ORTIZ A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1611: 91–97, 2003.

CASTELLANO P, BELFIORE C, VIGNOLO G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79: 483-499, 2008.

CHATTERJEE C, PAUL M, XIE L, VAN DER DONK WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Review*, 105(2): 633-684, 2005.

CHEN XH, KOUMOUTSI A, SCHOLZ R, SCHNEIDER K, VATER J, SÜSSMUTH R, PIEL J, BORRISS R. Genome analysis of *Bacillus*

*amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140: 27–37, 2009.

CHERIF A, OUZARI H, DAFFONCHIO D, CHERIF H, SLAMA KB, HASSEN A, JAOUA S, BOUDABOUS A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 243-247, 2001.

CHERIF A, REZGUI W, RADDADI N, DAFFONCHIO D, BOUDABOUS A. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. *Microbiological Research*, 163: 684-692, 2008.

CHO KM, MATH RK, HONG SY, ASRAFUL ISLAM SM, MANDANNA DK, CHO JJ, YUN MG, KIM JM, YUN HD. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control*, 20: 402-406, 2009.

CHUNG KT, DICKSON JS, CROUSE JD. Effects of Nisin on Growth of Bacteria Attached to Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6): 1329-1333, 1989.

CINQUEMANI E, PORRECA R, FERRARI-TRECATE G, LYGEROS J. Subtilin production by *Bacillus subtilis*: stochastic hybrid models and parameter identification. *IEEE Trans. Automat. Contr., Special Issue on Systems Biology*, 53: 38–50, 2007.

CINTAS LM, CASAS P, HOLO H, HERNANDEZ PE, NES IF, HÅVARSTEIN LS. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180 (8): 1988–1994, 1998.

CLADERA-OLIVERA F, CARON GR, BRANDELLI A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 251-256, 2004.

CLADERA-OLIVERA F, CARON GR, MOTTA AS, SOUTO AA, BRANDELLI A. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 533-539, 2006.

CLEVELAND J, MONTVILLE TJ, NES IF, CHIKINDAS ML. Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1): 1-20, 2001.

COOPER DG, MACDONALD CR, DUFF SJB, KOSARIC N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied Environmental Microbiology*, 42(3): 408–412, 1981.

COSMINA P, RODRIGUEZ F, DE FERRA F, PEREGO M, VENEMA G, VAN SINDEREN D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 8: 821–831, 1993.

COTTER PD, HILL C, ROSS RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788, 2005.

COUTTE F, LECLÈRE V, BÉCHET M, GUEZ JS, LECOUTURIER D, CHOLLET-IMBERT M, DHULSTER P, JACQUES P. Effect of *pps* disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x, 2010.

DAHL MK, MSADEK T, KUNST F, RAPOPORT G. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 267:14509–14514, 1992.

DARTOIS V, DEBARBOUILLE M, KUNST F, RAPOPORT G. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180:1855–1861, 1998.

DAS P, MUKHERJEE S, SEN R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1575-1584, 2008.

DAW MA, FALKINER FR. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27(6): 467-479, 1996.

DE LUCCA AJ, WALSH TJ. Antifungal peptide: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1): 1–11, 1999.

DEEGAN LH, COTTER PD, HILL C, ROSS P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071, 2006.

DEL CAMPO R, TENORIO C, JIMÉNEZ-DÍAZ R, RUBIO C, GOMEZ-LUS C, BAQUERO F, TORRES C. Bacteriocin Production in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible *Enterococcus* Isolates of Different Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3): 905-912, 2001.

DESAI JD, BANAT IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1): 47–64, 1997.

DOMINGUEZ APM, BIZANI D, CLADERA-OLIVERA F, BRANDELLI A. Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35: 238–243, 2007.

DONG YH, ZHANG XF, XU JL, ZHANG LH. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia corotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 954-960, 2004.

DRIDER D, FIMLAND G, HÉCHARD YH, MCMULLEN LM, PRÉVOST H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 564-582, 2006.

DUITMAN EH, HAMOEN LW, REMBOLD M, VENEMA G, SEITZ H, SAENGER W, BERNHARD F, REINHARDT R, SCHMIDT M, ULLRICH C, STEIN T, LEENDERS F, VATER J. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *PNAS USA*, 96:13294–13299, 1999.

EIJSINK VGH, SKEIE M, MIDDELHOVEN PH, BRURBERG MB, NES IF. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9): 3275-3281, 1998.

EL-SERSY NA, EBRAHIM HAH, ABOU-ELELA GM. Response surface methodology as a tool for optimizing the production of antimicrobial agents from *Bacillus licheniformis* SN2. *Current Research in Bacteriology*, 3(1): 1-14, 2010.

ENNAHAR S, SASHIHARA T, SONOMOTO K, ISHIZAKI A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1): 85-106, 2000.

FLORIANO B, RUIZ-BARBA JL, JIMÉNEZ-DÍAZ R. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12): 4883-4890, 1998.

GALVÉZ A, ABRIOUEL H, LÓPEZ RL, OMAR NB. Bacteriocin- based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51-70, 2007.

GARCÍA MT, BEN OMAR N, LUCAS R, PÉREZ-PULIDO R, CASTRO A, GRANDE MJ, MARTÍNEZ-CAÑAMERO M, GÁLVEZ A. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiology*, 20: 533-536, 2003.

GARNEAU S, MARTIN NI, VEDERAS JC. Two- peptide bacteriocins produced by latic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592, 2002.

GEBHARDT K, SCHIMANA J, MÜLLER J, FIEDLER HP, KALLENBORN HG, HOLZENKÄMPFER M, KRASTEL P, ZEECK A, VATER J, HÖLTZEL A, SCHMID DG, RHEINHEIMER J, DETTNER K. Screening for biologically active

metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2): 199-205, 2002.

GIONGO JL, LUCAS FS, CASARIN F, HEEB P, BRANDELLI A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 375–382, 2007.

GRAU A, GÓMEZ FERNÁNDEZ JC, PEYPOUOX F, ORTIZ A. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1418: 307-319, 1999.

GRAU A, ORTIZ A, GODOS AD, GÓMEZ-FERNÁNDEZ JC. A Biophysical study of the interaction of the Lipopeptide Antibiotic Iturin A with Aqueous Phospholipid Bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377(2): 315-323, 2000.

GROSSMAN AD. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Reviews of Genetics*, 29: 477-508, 1995.

GUILLEN N, WEINRAUCH Y, DUBNAU DA. Cloning and characterization of the regulatory *Bacillus subtilis* competence genes *comA* and *comB*. *Journal of Bacteriology*, 171: 5354–5361, 1989.

GUO Y, ZHENG H, YANG Y, WANG H. Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P94 isolated from soil in Beijing as a potential biocontrol agent. *Current Microbiology*, 55: 247-253, 2007.

GUPTA R, BEG QR, LORENZ P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15–32, 2002.

HAMMAMI I, RHOUMA A, JAOUADI B, REBAI A, NESME X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 253–260, 2009.

HAYASHI K, OHSAWA T, KOBAYASHI K, OGASAWARA N, OGURA M. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187: 6659–6667, 2005.

HEERKLOTZ H, WIEPRECHT T, SEELIG J. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR. *Journal of Physical Chemistry B*, 108: 4909–4915, 2004.

HIRADATE S, YOSHIDA S, SUGIE H, YADA H, FUJII Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61: 693-698, 2002.

HIRAOKA H, ANO T, SHODA M. Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74: 323–326, 1992.

HSIEH FC, LIN TC, MENG M, KAO SS. Comparing Methods for Identifying *Bacillus* Strains Capable of Producing the Antifungal Lipopeptide Iturin A. *Current Microbiology*, 56:1–5, 2008.

HSIEH FC, LI MC, LIN TC, KAO SS. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 49: 186–191, 2004.

HUANG CC, ANO T, SHODA M. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76: 445–450, 1993.

HUANG T, GENG H, MIYYAPURAM VR, SIT CS, VEDERAS JC, NAKANO MM. Isolation of a Variant of Subtilosin A with Hemolytic Activity. *Journal of Bacteriology*, 191(18): 5690–5696, 2009.

HUANG X, WEI Z, GAO X, YANG S, CUI Y. Optimization of Inactivation of Endospores of *Bacillus cereus* in milk by Surfactin and Fengycin Using a Response Surface Method. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 14: 89-95, 2008.

INAOKA T, TAKAHASHI K, OHNISHI-KAMEYAMA M, YOSHIDA M, OCHI K. Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP cooperatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 2169–2176, 2003.

JABBEN N, RASOOL SA, AHMAD S, AJAZ M, SAEED S. Isolation, identification and bacteriocin production by indigenous diseased plant and soil associated bacteria. *Pakistan Journal of Biological Science*, 7(11): 1893-1897, 2004.

JACK RW, TAGG JR, RAY B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59: 171–200, 1995.

KAISER AL, MONTVILLE TJ. Purification of the bacteriocin Bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* scott A cells and lipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12): 4529-4535, 1996.

KATZ E, DEMAIN AL. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews*, 41(2): 449–474, 1977.



KAWULKA KE, SPRULES T, DIAPER CM, RANDY MW, McKAY RT, MERCIER P, ZUBER P, VEDERAS JC. Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to a-carbon cross-links: formation and reduction of a-thio-a-amino acid derivatives. *Biochemistry*, 43: 3385–95, 2004.

KHALIL R, DJADOUNI F, ELBAHLOUL Y, OMAR S. The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain. *African Journal of Food Science*. 3(1): 011- 022, 2009.

KIM KM, LEE JY, KIM CK, KANG JS. Isolation and Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of Pharmacal Research*, 32(5): 711-715, 2009.

KIM, PYOUNG I, RYU J, KIM YH, CHI Y-T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1): 138-145, 2010.

KLAENHAMMER TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-45, 1993.

KLEANTHOUS C, HEMMINGES AM, MOORE GR, JAMES R. Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein – protein recognition. *Molecular Microbiology*, 28(2): 227-233, 1998.

KLEEREBEZEM M, BONGERS R, RUTTEN G, DE VOS WM, KUIPERS OP. Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the spa-box in subtilin-responsive promoters. *Peptides*, 25: 1415–1424, 2004.

KLEEREBEZEM M, QUADRI LEN, KUIPERS OP, VOS WM de. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram- positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24(5): 895-904, 1997.

KLEEREBEZEM M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 25: 1405–1414, 2004.

KLEIN C, ENTIAN KD. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8): 2793-2801, 1994.

KLEIN C, KALETTA C, ENTIAN KD. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1): 296-303, 1993.

KONG Q, SHAN S, LIU Q, WANG X, YU F. Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 31–35, 2010.

KOUMOUTSI A, CHEN X-H, VATER J, BORRIS R. DegU and YczE Positively Regulate the Synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21): 6953–6964, 2007.

KUIPERS OP, BEERTHUYZEN MM, DE RUYTER PG, LUESINK EJ, DE VOS WM. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 27299–27304, 1995.

KUNST F, OGASAWARA N, MOSZER I. *et al.* The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390: 249–256, 1997.

KUNST F, RAPOPORT G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177: 2403–2407, 1995.

LANG S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7 (1-2): 12-20, 2002.

LATOUD C, PEYPOUX F, MICHEL G. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modification of membrane permeability and lipid composition. *The Journal of Antibiotics*, 11:1588–1595, 1987.

LEE, K.D. *et al.* The class II bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta*, 229: 747-755, 2009.

LEROY F, DE VUYST L, Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4407-4413, 2001.

LEVERENTZ B, CANWAY WS, JANISIEWICZ W, ABADIAS M, KURTZMAN CP, CAMP MJ. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2): 1135-1140, 2006.

LISBOA MP, BONATTO D, BIZANI D, HENRIQUES JAP, BRANDELLI A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. *International Microbiology*, 9: 111-118, 2006.

MAGET-DANA R, PEYPOUX F. Iturins, a special class of poreforming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87: 151-174, 1994.

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

MAQUEDA M, SÁNCHEZ-HIDALGO M, FERNÁNDEZ M, MONTALBÁN-LÓPEZ M, VALDIVIA E, MARTÍNEZ-BUENO M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 2–22, 2008.

MARREC CL, HYRONIMUS B, BRESSOLIER P, VERNEUIL B, URDACI MC. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5213-5220, 2000.

MARTÍN-PLATERO AM, VALDIVIA E, RUÍZ-RODRÍGUEZ M, SOLER JJ, MARTÍN-VIVALDI M, MAQUEDA M, MARTÍNEZ-BUENO M. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the Hoopoe (*Upupa epops*). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6): 4245-4249, 2006.

MARX R, STEIN T, ENTIAN KD, GLASER SJ. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry*, 20(6): 501–506, 2001.

MCAULIFFE O, ROSS RP, HILL C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 285-308, 2001.

MIZUMOTO S, HIRAI M, SHODA M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 869-875, 2006.

MONTESINOS E. Antimicrobial peptide and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 270: 1-11, 2007.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 641-646, 2008.

MOTTA AS, CANNAVAN FS, TSAI SM, BRANDELLI A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Archives Microbiology*, 188: 367–375, 2007.

MOTTA AS, CLADERA-OLIVERA F, BRANDELLI A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 307-310, 2004.

MSADEK T. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 7(5): 201-207, 1999.

NAHANO MM, ZUBER P, GLASER P, DANCHIN A, HULETI FM. Two-component regulatory protein ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(13): 3796-3802, 1996.

NAKANO MM, CORBELL N, BESSON J, ZUBER P. Isolation and characterization of *sfp*: A gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 232: 313–321, 1992.

NAKANO MM, MAGNUSSON R, MYERS A, CURRY J, GROSSAMN AD, ZUBER P. *SrfA* is an operon required for surfactin production, competence development and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173: 1770–1778, 1991.

NAKANO MM, MARAHIEL MA, ZUBER P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170: 5662–5668, 1988.

NAKANO MM, 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*, 182(11): 3274-3277, 2000.

NAKANO MM, ZUBER P. Anaerobic growth of a “Strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annual Reviews Microbiology*, 52: 165-190, 1998.

NARUSE N, TENMYO O, KOBARU S, KAMEI H, MIYAKI T, KONISHI M, OKI T. Pumilacidint, a complex of new antiviral antibiotics production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 43(3): 267-280, 1990.

NES IF, DIEP DB, HAVARSTEIN LS, BRURBERG MB, EIJSINK V, HOLO H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113–128, 1996.

O'REILLY M, DEVINE KM. Expression of *AbrB*, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of *fis*, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(2): 522-529, 1997.

O'SULLIVAN L, ROSS RP, HILL C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84: 593-604, 2002.

OHNO A, ANO T, SHODA M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75: 23–27, 1993.

ONGENA M, JOURDAN E, ADAM A, PAQUOT M, BRANS A, JORIS B, ARPIGNY J-L, THONART P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4): 1084-1090, 2007.

ORTEGA-MORALES BO, ORTEGA-MORALES FN, LARA-REYNA J, ROSA-GARCÍA SC, MARTÍNEZ-HERMÁNDEZ A, MONTERO-M J. Antagonism of *Bacillus* spp. isolated from Marine Biofilms Against Terrestrial Phytopathogenic Fungi. *Marine Biotechnology*, 11(3): 375-383, 2009.

PARISOT J, CAREY S, BREUKINK E, CHAN WC, NARBAD A, BONEV B. Molecular mechanism of target recognition by Subtilin, a Class I Lanthionine Antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2): 612–618, 2008.

PARRET AHA, TEMMERMAN K, MORT RD. Novel Lectin-Like Bacteriocins of Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5197–5207, 2005.

PEYPOUX F, BONMATIN JM, WALLACH J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 553–563, 1999.

PHAE CG, SHODA M, KUBOTA H. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69: 1–7, 1990.

PILLET MF, DOUSSET X, BARRÉ R, NOVEL G, DESMAZEAUD M, PIARD JC. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 58(3): 256- 262, 1995.

RANDAZZO CL, PITINO I, SCIFO GO, CAGGIA C. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*, 20: 756-763, 2009.

RAZAFINDRALAMBO H, POPINEAU Y, DELEU M, HBID C, JACQUES P, THONART P, PAQUOT M. Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: Effect of lipid and peptide structural attributes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 911–916, 1998.

RILEY MA, WERTZ JE. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Reviews of Microbiology*, 56(8): 117-137, 2002.

RILEY MA. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetic*, 32: 255-278, 1998.

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

SANDRIN C, PEYPOUX F, MICHEL G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12: 370–375, 1990.

SANG Y, BLECHA F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, 9(2): 227–235, 2008.

SCHMITZ S, HOFFMANN A, SZEKAT C, RUDD B, BIERBAUM G. The lantibiotic mersacidin is an autoinducing peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7270–7277, 2006.

SCHNEIDER A, STACHELHAUS T, MARAHIEL MA. Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Molecular Genetics and Genomics*, 257: 308–318, 1998.

SCHNELL N, ENTIAN KD, GOTZ F, HARNER T, KELLNER R, JUNG G. Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. *FEMS Microbiology Letters*, 58: 263-268, 1989.

SCHNELL N, ENTIAN KD, SCHNEIDER U, GOTZ F, HARNER T, KELLNER R, JUNG G. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature*, 333: 276-278, 1988.

SCHULZ D, BONELLI RR, BATISTA CRV. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, 16 (4): 403-411, 2009.

SEBEI S, ZENDO T, BOUDABOUS A, NAKAYAMA J, SONOMOTO K. Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1621-1631, 2007.

SERROR P, SONENSHEIN AL. Cod Y is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *Journal of Bacteriology*, 178: 5910–5915, 1996.

SHELBURNE CE, AN FY, DHOLPE V, RAMAMOORTHY A, LOPATIN DE, LANTZ MS. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 297–300, 2007.

SHIMANE K, OGURA M. Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. *Journal of Biochemistry*, 136: 387-397, 2004.

SINGH P, CAMEOTRA SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnology*, 22: 142-147, 2004.

SIRTORI LR, CLADERA-OLIVERA F, LORENZINI DM, TSAI S-M, BRANDELLI A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 52: 357–363, 2006.

SOBRINO-LÓPEZ A, MARTÍN-BELLOSO O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18: 329-343, 2008.

SOUZA EL, SILVA CA, SOUSA CP. Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservative. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4): 559-566, 2005.

STEIL L, HOFFMANN T, BUDDE I, VOLKER U, BREMER E. Genome wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Journal of Bacteriology*, 185: 6358–6370, 2003.

STEIN T, BORCHERT S, KIESAU P, HEINZMANN S, KLOSS S, KLEIN C, HELFRICH M, ENTIAN K-D. Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 44: 403–416, 2002.

STEIN T, DÜSTERHUS S, STROH A, ENTIAN KD. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 2349–2353, 2004.

STEIN T, HEINZMANN S, KIESAU P, HIMMEL B, ENTIAN K-D. The spabox for transcriptional activation of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 47: 1627–1636, 2003.

STEIN T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845–857, 2005.

STEIN T. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22: 1146–1152, 2008.

STRAUCH MA, BOBAY BG, CAVANAGH J, YAO F, WILSON A, LE BRETON Y. Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression. *Journal of Bacteriology*, 189(21):7720–7732, 2007.

SUGITA S, HIROSE Y, MATSUO N, DEGUCHI Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*, 165: 269-280, 1998.

SUGITA S, MATSUO N, HIROSE Y, IWATO M, DEGUCHI Y. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4986-4989, 1997.

SUN G, BIRKEY SM, HULETT FM. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 19(5): 941–948, 1996.

SUTYAK KE, WIRAWAN RE, AROUTCHEVA AA, CHIKINDAS ML. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1067-1074, 2008.

SWE PM, HENG NCK, TING Y-T, BAIRD HJ, CARNE A, TAUCH A, TAGG JR, JACK RW. ef1097 and ypkK encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 153: 3218-3227, 2007.

SZCZECH M, SHODA M. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Phytopathology*, 154: 370–377, 2006.

THIMON L, PEYPOUX F, MAGET-DANA R, MICHEL G. Surface –active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(1): 92–93, 1992.

TIWARI BK, VALDRAMIDIS VP, O'DONNELL CP, MUTHUKUMARAPPAN K, BOURKE P, CULLEN PJ. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5967-6000, 2009.

TOKUDA Y, ANO T, SHODA M. Survival of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal–antibiotic iturin producer, and its transformant in soil-systems. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75: 107–111, 1993.

TORAYA T, MAOKA T, TSUJI H, KOBAYASHI M. Purification and structural determination of an inhibitor of starfish oocyte maturation from a *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): 1799-1804, 1995.

TOURÉ Y, ONGENA M, JACQUES P, GUIRO A, THONART P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1151-1160, 2004.

TRIAS R, BAÑERAS L, SEGUI EM, ROMANYÓ EB. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol of phytopathogenic bacteria and fungus. *International Microbiology*, 11: 231-236, 2008.



TSUGE K, AKIYAMA T, SHODA M. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*, 183(21): 6265–6273, 2001.

TSUGE K, ANO T, HIRAI M, NAKAMURA Y, SHODA M. The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9): 2183–2192, 1999.

URSO R, RANTSIOU K, CANTONI C, COMI G, COCOLIN L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 232-239, 2006.

WEST SA, DIGGLE SP, BUCKLING A, GARDNER A, GRIFFIN AS. The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38: 53–77, 2007.

WILLEY JM, VAN DER DONK WA. Lantibiotics: Peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, 61: 477-501, 2007.

XIE L, CHATTERJEE C, BALSARA R, OKELEY NM, VAN DER DONK WA. Heterologous expression and purification of SpaB involved in subtilin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295: 952–957, 2002.

XU D, CÔTÉ JC. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S–23S ITS nucleotide sequences. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 695–704, 2003.

YAO S, GAO X, FUCHSBAUER N, HILLEN W, VATER J, WANG J. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 47: 272–277, 2003.

YU GY, SINCLAIR JB, HARTMAN GL, BERTAGNOLLI BL. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry*, 34(7): 955–963, 2002.

ZALÁN Z, NÉMETH E, BARÁTH A, HALASZ A. Influence of growth medium in hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 219– 225, 2005.

ZAMFIR M, GROSU-TUDOR S. Impacto of stress conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 and production of acidophilin 801. *Journal of General and Applied Microbiology*, 55 (4): 277-282, 2009.

ZHENG G, YAN LZ, VEDERAS JC, ZUBER P. Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin Subtilosin. *Journal of Bacteriology*, 181(23): 7346-7355, 1999.

ZHENG GR, ZUBER P. Mutational analysis of *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. *Journal of Bacteriology*, 182: 3266–3273, 2000.

ZUBER PM, NAKANO M, MARAHIEL MA. Peptide antibiotics of bacilli and other gram-positive bacteria. In: SONENSHEIN AL, HOCH J, LOSICK R. (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., pp 897–916, 1993.

## CURRICULUM VITAE RESUMIDO

VELHO, R.V.

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Renata Voltolini Velho

**Local e data de Nascimento:** 7 de dezembro de 1985. Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Endereço Profissional:** Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, Porto Alegre, RS

**Telefone profissional:** (51) 3308-6249      **E-mail:** re.voltolini@hotmail.com

2. **FORMAÇÃO:** Ciências Biológicas - Universidade de Cruz Alta (Março de 2003 a Dezembro de 2006); Curso de Pós-Graduação *latu sensu* em Biologia da Conservação e Tecnologias Ambientais – Universidade de Cruz Alta (Março de 2007 a Fevereiro de 2008); Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* (mestrado) em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Setembro de 2008 a Setembro de 2010).
3. **ESTÁGIOS:** Estágio voluntário no Laboratório de Patologia e Citogenética do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS (72 horas).
4. **PRÊMIOS E DISTINÇÕES:** Bolsa de estudos integral no Curso de Especialização em Biologia da Conservação e Tecnologias Ambientais (UNICRUZ) por obter a maior média na Graduação.
5. **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR:** Professor titular da disciplina de Biologia no Cursinho Pré-Vestibular X da Questão, Cruz Alta, RS (06 a 12/2003);
6. **ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS:** VELHO, R. V.; BAIOTTO, C. R. A Influência do Ácido Fólico na Não-Disjunção do Cromossomo 21 em Mães da Cidade de Cruz Alta - RS. Espaço Ciência & Saúde, v. 02, p. 35-45, 2008.
7. **RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:** MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F.; BRANDELLI, A. Identificação e Resistência a Barreiras Biológicas de

Bactérias lácticas Isoladas de Leite e Queijo de Ovelha. In: 3 Simpósio de Segurança Alimentar Rompendo Barreiras, 2010, Florianópolis. Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar Rompendo Barreiras, 2010. BASSO, A. P.; VELHO, R. V.; BRANDELLI, A. Caracterização da linhagem LBM 5006 *Bacillus amyloliquefaciens* quanto ao seu potencial como produtora de bacteriocinas. In: XXI Salão Iniciação Científica; XVIII Feira Iniciação Científica; IV Salão UFRGS Jovem, 2009, Porto Alegre. XXI Salão Iniciação Científica; XVIII Feira Iniciação Científica; IV Salão UFRGS Jovem, 2009. VELHO, R. V.; MEDINA, L. F.; VALIATI, V. H.; BRANDELLI, A. Identificação de genes de bacteriocinas em linhagens de *Bacillus* isolados da região Amazônica. In: 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia. Anais do 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009. BASSO, A. P.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F.; VALIATI, V. H.; BRANDELLI, A. Caracterização da linhagem LBM 5006 *Bacillus amyloliquefaciens* quanto ao seu potencial como produtora de bacteriocinas. In: 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia. Anais do 55 Congresso Brasileiro de Genética, 2009. VELHO, R. V.; MEDINA, L. F.; BASSO, A. P.; BRANDELLI, A. Identificação de genes de bacteriocinas em linhagens de *Bacillus* isolados da região Amazônica. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009, Porto Alegre. XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009. BASSO, A. P.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F.; BRANDELLI, A. Identificação de genes de bacteriocinas em *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 isolado de solo de Mata Atlântica. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre. XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009.