

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atividade antibacteriana de *Burkholderia* spp.
endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar**

Viviane Colombari Pedrazzini dos Santos

**Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Viviane Colombari Pedrazzini dos Santos
Biomédica

**Atividade antibacteriana de *Burkholderia* spp.
endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **WELINGTON LUIZ DE ARAUJO**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Santos, Viviane Colombari Pedrazzini dos

Atividade antibacteriana de *Burkholderia* spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar / Viviane Colombari Pedrazzini dos Santos. - - Piracicaba, 2010.
114 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010

1. Bactérias 2. Cana-de-açúcar 3. Metabólitos secundários 4. Microrganismos endofíticos 5. Rizosfera I.Título

CDD 633.61
S237a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*A Deus por me guiar pelas suas veredas e me ensinar dia após dia
que há tempo para todas as coisas debaixo do sol...
E ao meu amado marido Marcos Aurélio pelo seu amor,
desprendimento, cumplicidade... e por saber e me ensinar a esperar...
essa vitória é nossa My Godsent!*

DEDICO

*Aos meus amados pais José Manoel e Rosa Maria
pelo amor incondicional, pelos preciosos ensinamentos e por serem o
alicerce e instrumentos de Deus em minha vida,*

*Aos meus queridos sogros Sr. Celso e D. Ana
pelo amor sincero que me acolhe,*

*Aos meus irmãos preciosos José Manoel e Gleice Cristina
pelo amor e por caminharem sempre comigo,*

*Aos meus cunhados e cunhadas
pela amizade, carinho e torcida...
e ao meu sobrinho Luis pela alegria nos intervalos.*

*Obrigada família!
Em vocês Deus me concede o que há de melhor nessa vida!
Amo todos vocês!*

OFEREÇO

“Os céus declaram, a glória de Deus; o firmamento proclama a obra das suas mãos. Um dia fala a outro dia; uma noite o revela a outra noite. Sem discurso nem palavras, não se ouve a sua voz. Mas a sua voz ressoa por toda a terra, e as suas palavras, até os confins do mundo.” (Sl 19:1-4)

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, meu melhor amigo, por conduzir meus passos em mais esta etapa da minha vida.

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pelo exemplo de pesquisador e por ter acreditado em mim, concedendo o estímulo, apoio e a liberdade que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelo grandioso exemplo de pesquisador, pela sua presença suave e motivadora e principalmente por ter me recebido inicialmente e dado a orientação necessária para que eu prosseguisse nesse caminho.

A Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner pelo exemplo profissional e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e Dra. Mônica Labate pela colaboração, dicas e disponibilização de equipamentos.

Ao irmão, amigo e companheiro de curso José Manoel Colombari Filho pela companhia, apoio, auxílio nas correções e pela formatação do trabalho.

A Paulo Pedrazzini pela amizade e pela ajuda na montagem e edição das figuras.

A Maria Carolina Quecine pela amizade e por todas as valiosas dicas durante os experimentos de clonagem e *Southern Blot*.

A Anderson Ferreira pela amizade, pelas conversas científicas e pela ajuda na obtenção da biblioteca de transformantes.

A Léia Cecília de Lima Favaro pelo auxílio na análise das sequências, pelas valiosas sugestões durante a etapa de discussão do trabalho e pela amizade.

As colegas do grupo de pesquisa em *Burkholderia* da Universidade de Mogi das Cruzes: Emy Mano e Aline Neves pela amizade e troca de experiências.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos conhecimentos compartilhados que tanto contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo”: Aline Romão, Andrea Bogas, Armando Cavalcanti, Anderson Ferreira, Ana Paula Pallu, Carlos Ivan Vildoso, Cláudia Vitorello, Danice Luvizotto, Francisco Andreote, Fernanda Sebastianes, Fernanda Bernardes, Joelma Marcon, José Antonio da Silva, Laura Assumpção, Léia Fávaro, Luciana Cursino, Maria Beatriz Calderan, Marise Suzuki, Michele Silva, Manuella Dourado, Paulo Lacava, Priscilla Rosseto, Renata de Assis, Ricardo Yara, Sarina Tsui, Uira Belmonte. Saibam que cada um de vocês deixou um pouco de si na minha história.

Aos funcionários do Departamento de Genética por sempre me acolherem em minhas necessidades acadêmicas.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes (Beto), do laboratório de Genética de Leveduras/ESALQ, pela simpática amizade e pela disponibilização de equipamentos de laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Maringoni do Departamento de Produção Vegetal (UNESP/Botucatu) e Profa. Dra. Margarida Fumiko Ito (IAC/Campinas) por disponibilizarem as linhagens de bactérias fitopatogênicas utilizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Azevedo e a Dra. Salete Gaziola do laboratório de Bioquímica de Plantas/ESALQ pelo auxílio e pela disponibilização de equipamentos.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela receptividade e pela disponibilização de equipamentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho o meu...

... Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 DESENVOLVIMENTO	25
2.1 Revisão de Literatura.....	25
2.1.1 A Cana-de-açúcar	25
2.1.2 Bactérias endofíticas	26
2.1.3 Bactérias rizosféricas	27
2.1.4 Gênero <i>Burkholderia</i>	28
2.1.5 Metabólitos secundários ou peptídeos antimicrobianos.....	30
2.1.5.1 Peptídeos ribossomais: bacteriocinas	31
2.1.5.2 Peptídeos não-ribossomais	33
2.1.5.2.1 Peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS)	34
2.1.5.2.2 Policetídeo sintase (PKS)	34
2.1.6 Potencialidades e aplicações de peptídeos antimicrobianos na área agrícola	35
2.1.6.1 Bacteriocinas	36
2.1.6.2 Peptídeos não-ribossomais	37
2.1.7 Peptídeos antimicrobianos em bactérias endofíticas e no gênero <i>Burkholderia</i>	39
2.2 Material e Métodos	41
2.2.1 Linhagens bacterianas.....	41
2.2.2 Atividade antibacteriana de linhagens de <i>Burkholderia</i> spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar	44
2.2.2.1 Método da sobrecamada (<i>spot-on-the-lawn</i>)	44
2.2.3 Fatores de interferência na atividade antibacteriana.....	44
2.2.3.1 Exclusão da ação de bacteriófagos	45
2.2.3.2 Influência do meio de cultura na atividade antibacteriana.....	45

2.2.3.3 Avaliação da estabilidade térmica.....	45
2.2.3.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas.....	46
2.2.4 Obtenção e avaliação de fatores de interferência na atividade antibacteriana do extrato cru	46
2.2.4.1 Método de difusão em ágar.....	46
2.2.4.2 Definição de unidade arbitrária no extrato cru	47
2.2.4.3 Avaliação da estabilidade térmica do extrato cru.....	47
2.2.4.4 Avaliação da sensibilidade do extrato cru a diferentes pHs.....	47
2.2.4.5 Avaliação da sensibilidade enzimática do extrato cru.....	48
2.2.5 Precipitação fracionada com sulfato de amônia.....	48
2.2.5.1 Quantificação de proteínas no extrato cru e nas frações precipitadas com sulfato de amônia	49
2.2.6 Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra bactérias fitopatogênicas	49
2.2.7 Mutagênese por inserção aleatória utilizando transposon	49
2.2.7.1 Teste de sensibilidade a canamicina	49
2.2.7.2 Mutagênese utilizando transposon.....	50
2.2.7.3 Seleção quanto à alteração na atividade de antagonismo bacteriano.....	51
2.2.7.3.1 Confirmação da transformação por PCR	51
2.2.7.3.2 Análise de <i>Southern Blot</i>	52
2.2.7.4 Clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o transposon	54
2.2.7.4.1 Extração de DNA bacteriano.....	54
2.2.7.4.2 Clonagem das regiões flanqueadoras do transposon.....	54
2.2.7.5 Sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon.....	56
2.3 Resultados e Discussão	57
2.3.1 Atividade antibacteriana de linhagens de <i>Burkholderia</i> spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar.....	57
2.3.2 Fatores de interferência na atividade antibacteriana	61
2.3.3 Obtenção e avaliação de fatores de interferência na atividade antibacteriana do extrato cru	61
2.3.4 Precipitação fracionada com sulfato de amônia.....	64
2.3.5 Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra bactérias fitopatogênicas	67

	13
2.3.6 Mutagênese por inserção aleatória utilizando transposon	68
2.3.6.1 Teste de sensibilidade a canamicina.....	68
2.3.6.2 Mutagênese utilizando transposon e seleção quanto à alteração na atividade de antagonismo bacteriano	68
2.3.6.3 Confirmação da transformação por PCR e análise de <i>Southern Blot</i>	69
2.3.6.4 Clonagem, sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon	73
3 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS	95

RESUMO

Atividade antibacteriana de *Burkholderia* spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar

A cultura de cana-de-açúcar ocupa posição de destaque nos cenários nacional e internacional devido principalmente a produção de etanol como fonte de energia renovável e menos nociva ao ambiente. Entretanto um dos obstáculos à produtividade é a ocorrência de várias doenças dentre elas a escaldadura das folhas causada por *Xanthomonas albilineans*. Bactérias endofíticas e rizosféricas pertencentes ao gênero *Burkholderia* tem sido isoladas com alta frequência em diferentes culturas como, por exemplo, a cana-de-açúcar. Nas últimas décadas, estas bactérias têm recebido especial atenção devido ao seu potencial como promotoras de crescimento vegetal, como agentes de biorremediação, mas muito pouco é explorado quanto ao potencial biotecnológico dessas bactérias como agentes de biocontrole de doenças. Visto que essas bactérias vivem em um ambiente altamente competitivo e sujeito a flutuações ambientais, representam uma fonte altamente significativa de metabólitos secundários bioativos, como as bacteriocinas sintetizadas ribossomicamente e outros peptídeos não ribossomais. Portanto, os objetivos principais deste trabalho foram determinar a frequência de linhagens de *Burkholderia* spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar capazes de produzir bacteriocinas e outros metabólitos secundários e por meio de mutagênese aleatória por transposon, identificar genes associados a produção desses metabólitos. Os resultados de caracterização permitiram concluir que as bactérias endofíticas e rizosféricas pertencentes ao gênero *Burkholderia* avaliadas apresentaram grande potencial em produzir metabólitos com atividade antibacteriana *in vitro*; sendo capazes de controlar *X. albilineans* importante patógeno da cultura de cana-de-açúcar. Para uma das linhagens foi obtida uma biblioteca de mutantes, a qual foi parcialmente caracterizada quanto à alteração da atividade antibacteriana. Foram identificados doze mutantes que apresentaram perda da atividade antibacteriana. A análise das sequências flanqueadoras do transposon para os doze mutantes permitiu a identificação de genes associados a produção de bacteriocinas, a regulação da expressão gênica, a enzimas possivelmente associadas ao metabolismo secundário, ao metabolismo geral da célula e a proteínas hipotéticas. A identificação e clonagem de tais genes permitirão uma maior compreensão da produção desses compostos e futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; *Burkholderia* spp.; Endófito; Metabólitos secundários; Bacteriocinas.

ABSTRACT

Antibacterial activity of *Burkholderia* spp. endophytic and of the rhizosphere of sugarcane

The sugarcane crop has an important role in international and national scenery mainly because the ethanol production as a sustainable energy source and less harmful to the environment. However one of the obstacles to the productivity is the occurrence of several diseases among them leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans*. Endophytic and rhizospheric bacteria that belong to the *Burkholderia* genus have been isolated in high frequency in different cultures, such as sugarcane. In the last decades, these bacteria have been receiving attention due their potential as plant growth promoters, bioremediation agents. However, the biotechnological potential of these bacteria as agents of diseases biocontrol is very poorly evaluated. Since these bacteria live in a highly competitive environment and subject to environmental fluctuations, they may represent a highly significant source of bioactive secondary metabolites, as ribosomal synthesized bacteriocins and other nonribosomal peptides. Therefore, the main aim of this work was to determine the frequency of bacteriocin and secondary metabolites production by endophytic and rhizospheric isolates of *Burkholderia* spp. from sugarcane. Also, the genes associated to synthesis of these metabolites were identified by random mutagenesis based on Tn5 transposon. The results showed that endophytic and rhizospheric *Burkholderia* spp. present *in vitro* potential to production of metabolites with antibacterial activity; being inhibited *X. albilineans*, an important pathogen of sugarcane crops. For one of the *Burkholderia* strain it was obtained a mutant library, which was partially characterized according to antibacterial activity. Twelve mutants that showed the loss of antibacterial activity were identified and further evaluated. Also, the analysis of the transposon flanking sequences for these mutants indicated that genes associated to the bacteriocin production, regulation of gene expression, enzymes possibly associated to the secondary metabolism, general metabolism of the cell and hypothetical proteins are related to loss of inhibition ability. The identification and cloning of such genes will allow a better understanding of the production of these compounds and further biotechnological applications.

Keywords: Sugarcane; *Burkholderia* spp.; Endophyte; Secondary metabolites; Bacteriocins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Transposon EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2>Tnp utilizado para mutagênese aleatória. O transposon EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2> forma um complexo estável com a enzima transposase EZ-Tn5, contém uma origem de replicação condicional (R6K γ ori) e gene de resistência a canamicina (Tn903) que são funcionais em *E. coli*, flanqueados por sequências de reconhecimento (ME) da EZ-Tn-5 Transposase (Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA) 51
- Figura 2 - Zonas de inibição de linhagens de *Burkholderia* spp. frente a bactéria indicadora *P. fluorescens*. As setas indicam os halos de inibição 58
- Figura 3 - Avaliação da estabilidade térmica a 80°C por 15 minutos (A): Controle; (B): após tratamento. (Bactéria indicadora: *C. flaccumfaciens* EF1/6)..... 62
- Figura 4 - Influência do meio de cultura no antagonismo de linhagens de *Burkholderia* spp. LB (A; C); TSA 10% (B; D) (Bactéria indicadora: *X. albilineans*)..... 62
- Figura 5 - Atividade antibacteriana do extrato cru da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 frente à *C. flaccumfaciens* EF1/6 sem nenhum tratamento 63
- Figura 6 - Atividade antibacteriana do extrato cru da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 frente a *C. flaccumfaciens* EF1/6 após tratamento com enzimas proteolíticas (A: pronase E; B: DNase; C: lisozima; D: tripsina; E: proteinase K), após exposição a diferentes temperaturas (F: 37°C/1 h; G: 42°C/1 h; H: 65°C/30 min; I: 80°C/30 min; J: 100°C/15 min) e após exposição a diferentes valores de pH (K: pH = 3; L: pH = 4; M: pH = 5; N: pH = 6; O: pH = 8; P: pH = 9; Q: pH = 10; R: pH = 11) 63
- Figura 7 - Exemplo de placa de caracterização de transformantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3. É possível visualizar transformantes que perderam a capacidade antagonista frente a *X. albilineans*. A seta indica a zona de inibição da cepa selvagem 70
- Figura 8 - Amplificação de região do transposon com os primers Tn5F e Tn5R (WANG et al., 2008) a partir do DNA extraído dos doze transformantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antibacteriana. O transposon Tn5 extraído de *E. coli* DH5 α -pir. Tn5 foi utilizado como controle positivo. Não houve amplificação a partir do DNA genômico da linhagem selvagem TC3.4.2R3. O marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil) está posicionado na lateral esquerda e direita do gel

de agarose. A ordem dos transformantes, da esquerda para a direita é: TC3.4.2R3 M1 a M12.....70

Figura 9 - Hibridização por *Southern Blot* de cinco mutantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antibacteriana. 7,5 µg de DNA genômico foram clivados com *EcoRI* transferidos para membranas de nylon e sondados com um fragmento de 560 bp de uma região do transposon. A presença de bandas de tamanhos diferentes mostra integração aleatória, e uma banda confirma a inserção única. *EcoRI* não possui sítio de restrição dentro do transposon utilizado; portanto, todos os fragmentos sondados apresentaram tamanho superior a 2001 bp. (1) EZ-Tn5 <R6Kygori/KAN-2> (2) linhagem selvagem de *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 (3-6) Transformantes M1 a M5, respectivamente.....71

Figura 10 - Hibridização por *Southern Blot* de sete mutantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antibacteriana. 7,5 µg de DNA genômico foram clivados com *EcoRI* transferidos para membranas de nylon e sondados com um fragmento de 560 bp de uma região do transposon. A presença de bandas de tamanhos diferentes mostra integração aleatória, e uma banda confirma a inserção única. *EcoRI* não possui sítio de restrição dentro do transposon utilizado; portanto, todos os fragmentos sondados apresentaram tamanho superior a 2001 bp. (1) EZ-Tn5 <R6Kygori/KAN-2> (2) linhagem selvagem de *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 (3-9) Transformantes M6 a M12, respectivamente.....72

Figura 11 - DNA plasmidial contendo o transposon EZ-Tn5 <R6Kygori/KAN-2>KAN-2 extraído de células de *E. coli* DH5α-*pir* (QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN) e enviados para sequenciamento a jusante e a montante utilizando os primers FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e R6KAN-2 RP-1 (5'-CTACCCTGTGGAACACCTACATCT-3') que anelam nas extremidades do transposon. (A-G: Clones dos mutantes TC3.4.2R3 M1 a M7, respectivamente). O marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil) está posicionado na lateral esquerda do gel de agarose74

Figura 12 - Representação esquemática (A) e imagem de microscopia eletrônica (B) da estrutura da piocina R2 de *Pseudomonas aeruginosa*. O aspecto nativo apresenta-se como uma bainha estendida (ES) composta por 34 anéis, sendo cada um deles composto por 6 subunidades. A bainha contraída (CS), termina na base da placa (BP) com as fibras da cauda (TFi), revela o core (C). Fonte: MICHEL-BRIAND, BAYSSE (2002); WILLIAMS et al. (2008)79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Código de estoque e local de isolamento das linhagens de <i>Burkholderia</i> spp. avaliadas neste estudo	41
Tabela 2 - Linhagens bacterianas utilizadas como indicadoras da atividade antibacteriana em linhagens do gênero <i>Burkholderia</i>	43
Tabela 3 - Porcentagem de inibição e intervalo dos diâmetros da zona de inibição frente às bactérias indicadoras.....	57
Tabela 4 - Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas e da rizosfera pertencentes ao gênero <i>Burkholderia</i> pelo método de sobrecamada.....	59
Tabela 5 - Dados da precipitação nas diferentes frações de saturação com sulfato de amônia e do extrato cru da linhagem de <i>Burkholderia cenocepacia</i> TC3.4.2R3	66
Tabela 6 - Dados da precipitação nas diferentes frações de saturação com sulfato de amônia e do extrato cru da linhagem de <i>Burkholderia cepacia</i> TH2.2.3R3	66
Tabela 7 - Ensaio de antagonismo para as linhagens <i>B. cenocepacia</i> TC3.4.2R3 e <i>B. cepacia</i> TH2.2.3R3 frente a bactérias fitopatogênicas	67
Tabela 8 - Análise das sequências flanqueadoras do transposon de mutantes de <i>Burkholderia cenocepacia</i> TC3.4.2R3, endofítica de cana-de-açúcar, que apresentaram alteração na atividade antibacteriana.....	76

1 INTRODUÇÃO

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande” (Louis Pasteur)

A cultura de cana-de-açúcar no Brasil se destaca pela sua importância na economia, porém existem diversos fatores limitantes a produção, dentre eles a ocorrência de diferentes tipos de doenças causadas por vírus, fungos e bactérias que resultam em perdas e diminuição da qualidade. O controle de doenças em plantas se fundamenta principalmente no uso de pesticidas que são frequentemente sujeitos a regulamentações e restrições. Surge, portanto, a necessidade pela busca de novas alternativas de controle que sejam menos nocivas ao ambiente. Dentro desse contexto, os metabólitos secundários bioativos produzidos por micro-organismos tem despertado grande interesse como possíveis alternativas aos produtos químicos convencionais. Os micro-organismos secretam uma ampla variedade de peptídeos antimicrobianos sintetizados por via ribossomal (bacteriocinas) ou por vias não ribossomais (peptídeos e policetídeos) e que são a base para o desenvolvimento de análogos sintéticos, para a expressão em plantas transgênicas ou como ingredientes ativos em biopesticidas comerciais.

Bactérias associadas a plantas representam um universo potencial para a busca por esses compostos bioativos, pois habitam ambientes altamente competitivos e durante a evolução desenvolveram mecanismos biológicos a fim de concorrerem por nutrientes e nicho ecológico. Poucas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar peptídeos ribossomais, como as bacteriocinas, de isolados bacterianos com capacidade de se associar às plantas. As bacteriocinas podem ser altamente específicas, produzidas a baixo custo e provavelmente muito seguras para o ambiente, sendo excelentes candidatas para uso na agricultura, especialmente no controle de fitopatógenos. Quanto aos peptídeos não-ribossomais o enfoque tem sido maior na identificação de compostos com atividade antifúngica.

Bactérias endofíticas pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm sido isoladas com alta frequência por diversos autores em diferentes tipos de culturas como, por exemplo, arroz, uva, cebola, milho, café, eucalipto e cana-de-açúcar. Por isso o interesse por

esse gênero tem aumentado devido ao potencial como agente promotor de crescimento em plantas, representando uma alternativa válida para uma variedade de fertilizantes químicos e pesticidas; como agente de biorremediação pela capacidade de degradar compostos aromáticos presentes em certos herbicidas e pesticidas; e como agente de controle biológico de doenças agrícolas.

Visto que, bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm sido encontradas com alta frequência no interior da planta hospedeira, bem como habitantes da rizosfera. O estudo da produção de metabólitos secundários bioativos em isolados de cana-de-açúcar pode contribuir para a busca de alternativas no controle de doenças nessa cultura. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram: (i) determinar a frequência de *Burkholderia* spp. endofíticas e da rizosfera capazes de produzir bacteriocinas; (ii) obter uma biblioteca de mutantes por meio de mutação aleatória com transposon Tn5; (iii) caracterizar a biblioteca de mutantes quanto a perda da capacidade de produzir bacteriocinas e/ou antibióticos; e (iv) identificar genes de *Burkholderia* spp. envolvidos na síntese de metabólitos secundários com atividade antibacteriana.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de Literatura

2.1.1 A Cana-de-açúcar

Os primeiros relatos da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) no Brasil datam de 1522 quando foi trazida da ilha da madeira por Martin Afonso de Souza, e após ter sido introduzida foi destinada a produção exclusiva do açúcar durante o período colonial (BASTOS, 1987). No entanto, a partir de 1970, com o incentivo do governo brasileiro, a agroindústria canavieira concentrou seus esforços na utilização da cana-de-açúcar para a produção de etanol, o qual é utilizado como fonte de energia renovável. Este incentivo permitiu ao Brasil ser um país modelo no cenário internacional quanto à utilização do etanol como biocombustível.

A Companhia Nacional de Abastecimento - Conab, no âmbito de um programa de cooperação com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA, realizou recentemente o primeiro levantamento da safra 2010/2011 de cana-de-açúcar revelando que a lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão. A produção média estimada está em 82.103 Kg/ha, 0,6% maior que a safra 2009/2010. Já a previsão do total de cana moída é de 664.333,4 mil toneladas com incremento de 9,9% em relação a safra anterior, o que significa 59.820 mil toneladas a mais para a moagem nesta safra (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010).

Além da produção de açúcar, álcool combustível, e mais recentemente o biodiesel, os subprodutos da cana (bagaço, vinhaça e tona de filtro) são de grande importância socioeconômica na geração de energia, ração animal, aglomerados, fertilizantes entre outros. Devido à grande importância dessa cultura, fatores que aumentem o seu rendimento produtivo ou diminuam o custo de produção são importantes. Dentre os diversos fatores limitantes à produção, destacam-se a ocorrência e a severidade de doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, além do ataque de diversas pragas. Sendo que historicamente, na cultura da cana-de-açúcar no

mundo, são consideradas como as doenças mais importantes: carvão (*Ustilago scitaminea*), raquitismo das soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*) e mosaico (vírus do mosaico) (BLANCH, LEGAZ, VICENTE, 2008).

Dentro desse contexto muito pouco é explorado quanto ao potencial biotecnológico de micro-organismos endofíticos e da rizosfera, especialmente bactérias, como agentes de controle de doenças em detrimento ao uso de agroquímicos tóxicos ao homem e a outros organismos.

2.1.2 Bactérias endofíticas

Definem-se bactérias endofíticas como aquelas que têm como habitat o interior das plantas hospedeiras, ocorrendo principalmente nas folhas, ramos e raízes, sem causar danos às mesmas nem formar estruturas externas visíveis. Com base nessa definição alguns autores e pesquisadores consideram que todos os micro-organismos que habitam o interior das plantas pelo menos durante um estágio de seu ciclo de vida podem ser considerados endofíticos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000). Dessa forma, seriam considerados aqueles endófitos que apresentam uma fase epifítica (superfície das folhas) um tanto longa, bem como patógenos furtivos que podem viver assintomaticamente em seus hospedeiros por algum tempo em seu ciclo de vida (PILEGGI, 2006). Portanto a diferenciação entre endófitos, epífitas e fitopatógenos não é tão simples e pode ser puramente didática, pois na maioria das vezes os limites que definem cada categoria não são muito claros (AZEVEDO et al., 2000).

As bactérias endofíticas foram descobertas por Darnel em 1904 (TAN, ZOU, 2001) e desde então têm sido isoladas de diversas plantas hospedeiras, incluindo muitas de interesse econômico como arroz (BARRAQUIO, REVILLA, LADHA, 1997); citrus (ARAÚJO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002); batata (SESSITSCH et al., 2002; BERG et al., 2005); algodão (QUADT-HALLMANN, HALLMANN, KLOEPPER, 1997); cenoura (SURETTE et al., 2003); tomate (PILLAY, NOWAK, 1997); cana-de-açúcar (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; PIÑON et al., 2002); cevada (KUTTER,

HARTMANN, SCHMID, 2006); ervilha (ELVIRA-RECUENCO, VUURDE, 2000); soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004); videira (BELL et al., 1995); canola e trigo (GERMIDA et al., 1998); sorgo e trigo (ZINNIEL et al., 2002); eucaliptos (FERREIRA et al., 2008), entre outros.

Os micro-organismos endofíticos foram por muito tempo considerados como apresentando uma interação neutra com seus hospedeiros, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais aos mesmos. Porém, estudos posteriores revelaram propriedades de interesse, como proteção contra predadores e patógenos. Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes micro-organismos, como o aumento da resistência a fatores bióticos e abióticos, alterações em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, imunossuppressores, antitumorais, e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas e metabólitos secundários bioativos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; PILEGGI, 2006). Desta forma, os micro-organismos endofíticos são considerados um universo para a descoberta de novas substâncias, oferecendo assim um potencial para a exploração médica, industrial e particularmente agrícola.

2.1.3 Bactérias rizosféricas

As rizobactérias pertencem ao grupo daquelas que habitam a rizosfera, camada de solo que é influenciada pelo metabolismo das raízes e que exerce grande influência na microflora associada a ela (KANG, MILLS, 2004). A rizosfera atualmente é considerada a principal fonte de micro-organismos endofíticos, pois algumas bactérias são capazes de penetrar nos tecidos da raiz, ultrapassando a barreira da endoderme, atravessando o córtex da raiz para o sistema vascular e subsequentemente estabelecendo populações endofíticas em órgãos vegetais e reprodutivos (COMPANT et al., 2008).

A área da rizosfera também constitui o principal reservatório de agentes microbianos que atuam na ciclagem de nutrientes, produção de toxinas, biosurfactantes e enzimas extracelulares e que promovem o crescimento das plantas por meio da

fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitormônios, síntese de sideróforos e biocontrole de fitopatógenos (ARSHAD, FRANKENBERGAR, 1997).

Visto que essas bactérias vivem em um ambiente altamente competitivo e sujeito a flutuações ambientais representam uma fonte altamente significativa de isolados produtores de diversos metabólitos bioativos.

2.1.4 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* (classe Beta Proteobacteria) inclui bactérias na forma de bacilos Gram negativos, móveis e aeróbios e é composto por mais de 40 espécies descritas, as quais colonizam diferentes nichos, entre eles a rizosfera de inúmeras espécies vegetais, além da água, plantas, insetos, humanos, ambientes industriais e hospitalares. Várias espécies atraem o interesse biotecnológico e agrícola de indústrias para o biocontrole e a biorremediação, enquanto outras representam um grande problema como patógenos oportunistas na fibrose cística em pacientes imunocomprometidos (SAVOIA, ZUCCA, 2001; MAHENTHIRALINGAM, BALDWIN, DOWSON, 2008).

Em 1942, Walter H. Burkholder descreveu uma das primeiras espécies de *Burkholderia* sp., *Phytomonas caryophylli* (BURKHOLDER, 1942), mais tarde conhecida como *Pseudomonas caryophylli*. Em 1949, descreveu uma bactéria fitopatogênica capaz de causar podridão em aliáceas e deu a essa espécie o nome cepacia derivado de cebola (*Allium cepa*) e que posteriormente ficou conhecida como *Pseudomonas cepacia* (BURKHOLDER, 1950). Espécies do gênero *Burkholderia* foram durante muitos anos incluídas dentro do gênero *Pseudomonas* devido a extensa e indeterminada definição fenotípica. Entretanto, posteriormente, análises de hibridização RNAr-DNA indicaram considerável diversidade genética entre os membros destes dois gêneros e em 1992 seis espécies (*Pseudomonas solanacearum*, *P. pickettii*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. mallei* e *P. caryophylli*) foram transferidas para um novo gênero *Burkholderia* (YABUUCHI et al., 1992), sendo a espécie *B. cepacia* considerada espécie tipo para este novo gênero.

Posteriormente, Vandamme et al. (1997) e mais recentemente testes de hibridização de DNA revelaram que isolados originalmente classificados como sendo uma única espécie compõem na verdade várias espécies filogeneticamente associadas com grande semelhança fenotípica. Os grupos heterogêneos identificados foram coletivamente denominados complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), composto inicialmente por nove espécies (anteriormente genomovares), diferenciadas por técnicas moleculares em *B. cepacia* (VANDAMME et al., 1997), *B. multivorans* (VANDAMME et al., 1997), *B. cenocepacia* (VANDAMME et al., 2003), *B. stabilis* (VANDAMME et al., 2000), *B. vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995; VANDAMME et al., 1997), *B. dolosa* (VERMIS et al., 2004), *B. ambifaria* (COENYE et al., 2001), *B. anthina* e *B. pyrrocinia* (VANDAMME et al., 2002). Recentemente a posição taxonômica de clusters gênicos *recA* de isolados do complexo *B. cepacia* foi determinada através de taxonomia polifásica revelando e propondo oito novas espécies: *B. ubonensis*, *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov., *Burkholderia metallica* sp. nov. (VANLAERE et al., 2008); *Burkholderia lata* e *Burkholderia contaminans* (VANLAERE et al., 2009) totalizando até o momento dezessete espécies.

O Gênero *Burkholderia* apresenta alta versatilidade ecológica provavelmente devido ao tamanho do genoma, o qual é frequentemente composto por vários replicons grandes (dois a quatro) que podem variar em tamanho de 4,0 a 9 Mb, podendo conter plasmídeos, além de ilhas genômicas contendo elementos genéticos móveis (sequências de inserção, profagos) que conferem plasticidade ao genoma e explicam a versatilidade (VIAL et al., 2007). Surpreendentemente, bactérias com genomas grandes apresentam uma desproporção quanto a distribuição dos genes, sendo mais frequentes os associados ao metabolismo secundário e regulação do que os genes envolvidos com o metabolismo de nucleotídeos, divisão celular, replicação de DNA e tradução de proteínas quando comparado às bactérias cujo genoma é menor. Esta constatação pode explicar porque espécies que contêm genomas grandes dominam ambientes onde os recursos são escassos, mas diversos, tais como o solo (KONSTANTINIDIS, TIEDJE, 2004).

Embora alguns membros do gênero *Burkholderia* sejam patógenos ou associados com algumas doenças em seus hospedeiros, a grande maioria das espécies associadas às plantas não são patogênicas e podem apresentar uma interação neutra ou benéfica com os seus hospedeiros. Espécies de *Burkholderia* endofíticas e associadas à rizosfera têm sido isoladas com alta frequência por diversos autores em diferentes tipos de culturas como, por exemplo, a cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002; MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010), arroz (DIVAN-BALDANI, BALDANI, DÖBEREINER, 2000), uva (COMPANT et al., 2005), cebola (SESSITSCH et al., 2005), milho (REIS et al., 2004; PERIN et al., 2006), café (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2002).

Durante as últimas duas décadas, o interesse, por espécies pertencentes ao complexo *B. cepacia*, tem aumentado devido ao potencial como agentes promotores de crescimento em plantas, representando uma alternativa válida para uma variedade de fertilizantes químicos e pesticidas e como agentes de biorremediação pela capacidade de degradar compostos aromáticos presentes em certos herbicidas e pesticidas (TABACCHIONI et al., 2002; KILBANE et al., 1983).

2.1.5 Metabólitos secundários ou peptídeos antimicrobianos

O conjunto de processos metabólicos que desempenham função associada ao crescimento celular microbiano compõe o metabolismo primário, onde os principais metabólitos produzidos são enzimas, ácidos orgânicos, etanol entre outros. Entretanto em muitos micro-organismos têm sido observada a produção de compostos orgânicos que não estão envolvidos diretamente com o crescimento e reprodução. Estes compostos são produzidos na fase estacionária ou no final da fase de crescimento e são denominados metabólitos secundários ou peptídeos. Os peptídeos são extremamente diversificados em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, pigmentos ou antibióticos naturais (DEMAIN, 1998; KOLTER, MORENO, 1992; MOFFITT, NEILAN, 2000).

Esses peptídeos podem ser sintetizados por duas vias. A primeira via é a ribossomal que envolve a produção de peptídeos por todas as espécies de vida, incluindo bactérias, como o componente principal do sistema de defesa do hospedeiro (KOLTER, MORENO, 1992). Uma outra via é a não-ribossomal que inclui peptídeos drasticamente modificados e amplamente produzidos por bactérias. A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não protéicos, hidroxiácidos e substâncias policetídicas, especialmente elaboradas para serem incorporadas na estrutura desses peptídeos (HANCOCK, CHAPLE, 1999).

2.1.5.1 Peptídeos ribossomais: bacteriocinas

Originalmente as bacteriocinas eram denominadas colicinas, pois a maioria das pesquisas eram conduzidas com isolados de *Escherichia coli*, mas, após a constatação de que sua síntese era comum a outros grupos bacterianos, Jacob et al. (1953) propuseram o termo genérico bacteriocina.

As bacteriocinas são tradicionalmente definidas como peptídeos ou proteínas biologicamente ativas produzidas por bactérias em condições de estresse, e que são capazes de inibir em baixas concentrações isolados da mesma espécie, ou taxonomicamente relacionados (RILEY, WERTZ, 2002; SOUZA et al., 2005). Entretanto, existem compostos antimicrobianos de natureza protéica que ainda não são completamente definidos ou não cumprem com todas as características das bacteriocinas. O termo substância do tipo-bacteriocina (*bacteriocin-like*) foi proposto para essas substâncias que geralmente possuem um maior espectro de ação do que a definição clássica de bacteriocinas propõe, atuando contra uma variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas (LISBOA et al., 2006).

As bacteriocinas também podem ser designadas como antibióticos por definição, mas, diferem dos antibióticos clássicos principalmente por apresentarem espectro de ação restrito; conferirem imunidade à célula hospedeira; serem sintetizadas ribossomicamente e aparentemente não serem tóxicas para o hospedeiro, além de possuir um número maior de aplicações em diferentes áreas (SOUZA et al., 2005).

As bacteriocinas são moléculas com a atividade antibiótica mais abundante e diversificada, incluindo proteínas de diferentes tamanhos; modos de ação, massas molares; propriedades físicas e bioquímicas (PELCZAR, 1996; RILEY, WERTZ, 2002). Atualmente se sabe que as bacteriocinas são encontradas na maioria das espécies bacterianas, tanto Gram negativas quanto Gram positivas além de alguns membros do Domínio Archaea. De acordo com Klaenhammer (1993), 99% de todas as espécies bacterianas podem produzir ao menos uma bacteriocina, sendo que dentro de uma espécie cerca de dez ou mesmo cem diferentes tipos de bacteriocinas podem ser produzidas (RILEY, WERTZ, 2002; SOUZA et al., 2005).

Diversos esforços têm sido realizados no sentido de classificar de uma forma adequada as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas. Assim as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes. As bacteriocinas da classe I são pequenos peptídeos que atuam na membrana e que possuem o aminoácido modificado lantionina (por isso são denominados lantibióticos) e que sofrem várias modificações pós-traducionais antes de serem exportadas da célula. As bacteriocinas da classe I podem ainda ser subdivididas em função dos seus mecanismos de ação, que incluem a desestabilização da membrana, formação de poro e inibição da síntese da parede celular através da ligação a lipídeos específicos (CHATTERJEE et al., 2005).

As bacteriocinas da classe II representam um grupo diverso de pequenos peptídeos resistentes ao calor, não modificados e possuem mecanismo de ação similar às bacteriocinas da classe I (EIJSINK et al., 2002).

As bacteriocinas da classe III não são peptídeos, mas proteínas termolábeis que são classificadas de acordo com a habilidade de lisar a célula hospedeira. Outras classes de bacteriocinas reconhecidas em Gram positivas compõem peptídeos complexos cíclicos que possuem motivos contendo lipídeos e carboidratos (DE JONG et al., 2006; HOLTSMARK, EIJSINK, BRURBERG, 2008).

Para as bactérias Gram negativas ainda não foi proposto um sistema de classificação sendo que as bacteriocinas melhor caracterizadas e utilizadas como modelo são as colicinas produzidas por *Escherichia coli* que atuam primariamente

contra outras cepas pertencentes à mesma espécie, além de outras espécies entéricas relacionadas taxonomicamente. As colicinas demonstram uma ampla variação de estrutura e mecanismos de ação que incluem a formação de poros, inibição da síntese da parede celular, atividade DNase e RNase (CURSINO et al., 2002; HOLTSMARK, EIJSINK, BRURBERG, 2008).

Um outro grupo de bacteriocinas presente em Gram negativas são proteínas que afetam a membrana celular pela montagem de partículas que se assemelham a cauda de bacteriófagos, como por exemplo algumas subclasses de piocinas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* (MICHEL-BRIAND, BAYSSE, 2002).

Os determinantes genéticos de muitas bacteriocinas têm sido identificados. Alguns estão relacionados a plasmídeos de diferentes tamanhos, como por exemplo, as colicinas (CURSINO et al., 2002); a pediocina produzida por *Pediococcus*; a lactocina produzida por *Lactococcus lactis* (RAY, 2003) e a agrocina produzida por *Agrobacterium radiobacter* (KERR, 1980). Alguns estão relacionados ao cromossomo, como as piocinas (MICHEL-BRIAND, BAYSSE, 2002), enquanto que outros estão relacionados a transposons como a nisina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (RAY, 2003).

2.1.5.2 Peptídeos não-ribossomais

A biossíntese de peptídeos não-ribossomais foi estudada pela primeira vez na década de 70 por Fritz Lipmann e Whilst, na tentativa de identificarem um mecanismo simples de formação da cadeia polipeptídica, que poderia ter existido antes dos ribossomos. Observaram que alguns peptídeos antimicrobianos eram resistentes a ribonucleases e sintetizados por enzimas capazes de formar ligações peptídicas a partir de aminoácidos ligados ao tiol em uma rota semelhante à síntese de ácidos graxos (MOFFITT, NEILAN, 2000).

Peptídeos não-ribossômicos frequentemente contêm aminoácidos não usuais, incluindo aminoácidos não protéicos ou modificados. A habilidade destes complexos multienzimáticos de incluir tais aminoácidos e incorporá-los em ambos os peptídeos

cíclicos e lineares resulta em uma grande estrutura natural e diversa nas espécies bacterianas e fúngicas. Os peptídeos não-ribossômicos podem também atuar como esqueleto para a biossíntese de estruturas mais complexas ou podem ser incorporados como ácidos graxos ou policetonas. Tais estruturas podem ser biossintetizadas por sistemas de peptídeos sintetase mistos ou híbridos e policetídeo sintase (KLEINKAUF, Von DOHREN, 1996). Portanto, um grande número de estruturas são possíveis devido a diferentes combinações modulares nas etapas de alongação, redução após as reações de condensação e processamento pós-sintético dos produtos, tais como ciclização e glicosilação (MINOWA, ARAKI, KANEHISA, 2007).

2.1.5.2.1 Peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS)

Esta rota não-ribossomal é chamada de Peptídeo Sintetase Não-Ribossomal (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*) e é formada por um grande número de proteínas complexas chamadas sintetases ou NRPS. Os complexos multienzimáticos são organizados modularmente e representam ao mesmo tempo o molde e a maquinaria biossintética. As moléculas sintetizadas por NRPS são curtas (dois a quinze monômeros), incluindo uma alta densidade de aminoácidos não protéicos e frequentemente contêm aminoácidos ligados a outros peptídeos ou pontes dissulfeto. A diversidade de aminoácidos incorporados aos peptídeos NRPS é grande e por isso são chamados de monômeros ao invés de aminoácidos. Portanto, a estrutura primária dos peptídeos não-ribossomais não é sempre linear, podem também apresentar estruturas cíclicas ou ramificações (CABOCHE et al., 2009). Estes peptídeos possuem importantes propriedades biológicas tais como imunomoduladores, quelantes de ferro ou atividade antimicrobiana, que pode ser ilustrada pelo famoso antibiótico penicilina o qual é sintetizado a partir do precursor tripeptídeo-ACV produzido pela via NRPS.

2.1.5.2.2 Policetídeo sintase (PKS)

Uma outra classe de metabólitos secundários em destaque são os policetídeos (PK), que constituem uma família complexa de produtos naturais que são construídos a

partir de blocos simples de ácido carboxílico. Os policetídeos são produzidos por plantas, fungos e bactérias, sendo principalmente estudados em Actinomicetos, e possuem uma ampla atividade biológica por produzirem uma diversidade extraordinária de estruturas. Os compostos policetídeos apresentam atividades farmacológicas importantes como potentes antibióticos, antitumorais, antifúngicos, agentes imunossupressores e antivirais (JENKE-KODAMA, DITTMANN, 2009).

A biossíntese de PKS ocorre pela ação de no mínimo três domínios por módulo. O módulo principal consiste de um domínio aciltransferase (AT) para a transferência e seleção de uma unidade de ácido carboxílico, uma proteína carreadora acila (ACP) e um domínio betacetossintase (KS) para a condensação descarboxilativa (MINOWA, ARAKI, KANEHISA, 2007). A reação de condensação ocorre por ação do domínio KS que captura o grupamento acila do domínio ACP anterior via ataque nucleofílico em relação a acila já existente no domínio e condensa os dois grupamentos. Ao término da síntese enzimática o produto é liberado do complexo PKS por meio da atividade de tioesterase, catalisada pelo domínio de tioesterase (T) (JENKE-KODAMA, DITTMANN, 2009).

A principal diferença entre NRPSs e PKSs está no fato de que PKSs condensam ácidos carboxílicos a uma cadeia crescente para formar um produto e NRPSs adicionam aminoácidos (MINOWA, ARAKI, KANEHISA, 2007).

2.1.6 Potencialidades e aplicações de peptídeos antimicrobianos na área agrícola

Diante dos diferentes tipos de doenças associadas às plantações agrícolas e dos prejuízos gerados eleva-se a importância de aplicar métodos de controle que sejam menos impactantes sobre o ambiente. Vários peptídeos antimicrobianos são a base para o desenvolvimento de novos análogos sintéticos, ou têm sido expressos em plantas transgênicas para conferir proteção a doenças ou são secretados por micro-organismos para uso como ingredientes ativos de biopesticidas comerciais. Dessa

forma, os agentes biológicos com propriedades antagonistas têm recebido considerável atenção, como alternativa aos produtos químicos convencionais.

2.1.6.1 Bacteriocinas

Os estudos e aplicações atuais de bacteriocinas se concentram mais no uso como conservantes de alimentos enquanto que as pesquisas visando aplicações na área agrícola ainda são menos frequentes (GRAY et al., 2006). Mas, uma vez que as bacteriocinas podem ser altamente específicas, produzidas a baixo custo e provavelmente muito seguras para o ambiente, elas podem ser excelentes candidatas para uso na agricultura, especialmente no controle de fitopatógenos.

Tradicionalmente o estudo da produção de bacteriocinas por bactérias associadas às plantas tem sido mais focado nas bactérias fitopatogênicas, incluindo membros dos grupos das *Corynebacteria*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium* e *Clavibacter* (BIAGI, AZEVEDO, 1992; SEO et al., 2004; KERR, 1980; FREY et al., 1996; MARINGONI, KUROZAWA, 2002; LAVERMICOCCA et al., 2002; HOLTSMARK et al., 2007).

Dentro do gênero *Xanthomonas* já foram identificadas bacteriocinas nas espécies patogênicas *X. axonopodis* pv. *citri* (citrinina); *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (passifloricina) (BONINI et al., 2007); *X. campestris* pv. *vesicatoria* (TUDOR-NELSON et al., 2003); e *X. campestris* pv. *glycines* (glicinecina A) (HEU et al., 2001).

A glicinecina A produzida por *X. campestris* pv. *glycines*, apresenta grande potencial para o controle biológico de fitopatógenos, pois é capaz de inibir algumas espécies de *Xanthomonas* incluindo *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *pruni*, e *X. oryzae* pv. *oryzae* (HEU et al., 2001).

A partir de um isolado de *P. carotovora* subsp. *carotovora* 89-H-4, o gene de uma bacteriocina de baixo peso molecular foi clonado e sequenciado podendo ser

introduzido em tabaco, repolho chinês ou outras espécies de plantas por técnicas de transgenia para controle da podridão mole (CHUANG et al., 2007).

Dentro do grupo das *Pseudomonas*, Lavermicocca et al. (2002) purificaram uma bacteriocina produzida por *P. syringae* pv. *ciccaronei*, que inibe o crescimento de *P. syringae* subsp. *savastanoi*, agente de uma doença caracterizada por formações hiperplásicas sobre o caule e ramos da oliveira e ocasionalmente nas folhas e frutos.

Holtsmark et al. (2007) descreveram pela primeira vez a caracterização ao nível molecular de bacteriocinas produzidas por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* agente do cancro em tomate e foi capaz de inibir um outro fitopatógeno relacionado *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, agente da podridão em batata.

Um exemplo de uma bacteriocina em uso experimental na agricultura é a agrocina 84, que realiza o controle da galha da coroa. Para isso é feita a imersão, de sementes germinadas ou mudas, em uma suspensão de *Agrobacterium vitis* (Sin.: *A. radiobacter*) produtor da agrocina 84. Esse procedimento é eficaz contra a maioria das cepas de *A. tumefaciens* (KERR et al., 1980; PARRET, DE MOT, 2002).

A produção de bacteriocinas também pode ser observada em bactérias promotoras de crescimento (PGPR) que habitam a rizosfera, como em *Pseudomonas* spp. (PARRET, DE MOT, 2002; PARRET et al., 2005) e em outras rizobactérias (GROSS, VIDAVER, 1978; HAFEEZ et al., 2005).

2.1.6.2 Peptídeos não-ribossomais

Peptídeos antimicrobianos (AMP) que não são sintetizados pela via ribossomal apresentam sequências pequenas de peptídeos com pouco mais de 50 resíduos de aminoácidos e podem ser classificados com base em sua estrutura em peptídeos lineares que frequentemente adotam estrutura em hélice e ciclopeptídeos formando anéis. Os peptídeos lineares e cíclicos podem estar ligados a cadeias de ácidos graxos (lipopeptídeos) ou outras substituições químicas, resultando em moléculas complexas (pseudopeptídeos) (MONTESINOS, 2007).

Peptídeos lineares, denominados, *peptaibols*, são normalmente ricos em aminoácidos dialquilados tais como α -diaminobutírico e os *lipopeptaibols* possuem o N-terminal acilado composto por pequenas cadeias de ácidos graxos. Esses peptídeos até o momento somente foram descritos em vários fungos e demonstram atividade contra bactérias e fungos patogênicos para as plantas (CHUGH, WALLACE, 2001).

Já os ciclopeptídeos são compostos de resíduos de aminoácidos normalmente sem pontes dissulfeto arranjados em anel. Dependendo da natureza da ciclização, os ciclopeptídeos tem somente um anel ou podem apresentar uma cauda de peptídeo adicional que pode ser lipídica pela presença de um grupo acila. Os ciclopeptídeos lipídicos são produzidos por diversas bactérias presentes no solo e associadas as plantas demonstrando atividade antifúngica, antibacteriana, citotóxica e propriedades surfactantes (MONTESINOS, 2007).

Dentre as bactérias associadas às plantas, os ciclopeptídeos lipídicos com atividade antibacteriana e antifúngica, tem sido identificados principalmente dentro do gênero *Pseudomonas*, sendo classificados em sete grupos baseados no comprimento e composição dos ácidos graxos, na cauda e no anel peptídico (RAAIJMAKERS et al., 2006). Um exemplo são as siringomicinas e siringopeptinas que atuam como fatores de virulência em *Pseudomonas syringae*, mas também inibem bactérias Gram positivas (GRGURINA et al., 2005).

Os pseudopeptídeos de interesse no controle de doenças em plantas apresentam poucas ligações peptídicas e modificações complexas de aminoácidos e são produzidos por bactérias. As pantocinas, derivadas da alanina, são produzidas por cepas de *Pantoea agglomerans* e inibem a biossíntese de aminoácidos catalisada pela transaminase em *Erwinia amylovora*, agente causal da ferrugem em rosáceas (JIN et al., 2003).

Um dos fatores que torna atrativo o uso de AMPs como compostos antimicrobianos para o controle de doenças em plantas é o mecanismo de ação contra o micro-organismo alvo. A maioria dos AMPs são catiônicos e se ligam a superfície dos micro-organismos através de interação mediada por receptores e inserção na

membrana citoplasmática. Alguns rompem a membrana, mas outros a atravessam e interagem com alvos intracelulares como a síntese de ácidos nucleicos, de proteínas ou atividades enzimáticas (BRODGEN, 2005).

2.1.7 Peptídeos antimicrobianos em bactérias endofíticas e no gênero *Burkholderia*

O conhecimento a respeito da produção de bacteriocinas, dentro do universo endofítico é ínfimo, pois até o momento poucas espécies endofíticas foram estudadas, mostrando a necessidade de ampliar este conhecimento a fim de buscar alternativas sustentáveis para a agricultura.

Piñón et al. (2002) descreveram e purificaram a primeira bacteriocina em uma bactéria endofítica da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolada de cana-de-açúcar e outras culturas. *G. diazotrophicus* pode ocupar os mesmos espaços que o patógeno vascular *X. albilineans*, e neste trabalho foi observado que a bacteriocina produzida foi capaz de lisar a parede celular de *X. albilineans in vitro* de forma similar às piocinas descritas para várias espécies de *Pseudomonas*.

Cursino (2005) avaliou a produção de bacteriocinas por bactérias endofíticas isoladas de citrus e descreveu pela primeira vez substâncias do tipo bacteriocina nos gêneros *Curtobacterium* e *Methylobacterium*. Na espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* foi caracterizada e purificada parcialmente uma bacteriocina que apresentou peso molecular de 14 kDa *in situ* e revelou atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, incluindo patógenos humanos e de plantas como o importante fitopatógeno de citrus, *Xylella fastidiosa*.

O conhecimento da produção de bacteriocinas dentro do gênero *Burkholderia* é escasso. Até o momento não foram identificadas e caracterizadas bacteriocinas em espécies endofíticas, somente em espécies patogênicas como, por exemplo, *B. (Pseudomonas) solanacearum* (CUPPELS et al., 1978; ARWIYANTO et al., 1993; FREY et al., 1996) e em *B. cepacia* com o objetivo de realizar a caracterização fenotípica de

linhagens isoladas de pacientes com fibrose cística e de plantas (GONZALEZ, VIDAVER, 1979; GOVAN, HARRIS, 1985).

Através do programa BAGEL (<http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/bagel>) foram identificados em torno de 47 genes hipotéticos codificadores de bacteriocinas em espécies patogênicas de *B. cenocepacia* e *B. cepacia*, sugerindo que a produção de bacteriocinas pode ser uma estratégia competitiva para as espécies pertencentes a este grupo (DE JONG et al., 2006). Neste contexto, espécies endofíticas também devem produzir estas bacteriocinas, as quais poderiam ser utilizadas contra patógenos de plantas.

Os estudos e programas de *screening* de peptídeos não-ribossomais e policetídeos dentro do universo endofítico e rizobactérias têm descrito uma maior diversidade de compostos com atividade antifúngica, principalmente dentro do gênero *Burkholderia*.

A plataforma Norine (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>) é o primeiro banco de dados dedicado somente a peptídeos não-ribossomais (NRPS) juntamente com ferramentas para análise. Para cada peptídeo, esse banco de dados armazena a estrutura bem como as várias anotações referentes à atividade biológica, organismo produtor, referências bibliográficas entre outros (CABOCHE et al., 2008). Até o presente momento, o Norine contém 1.071 peptídeos depositados, dentre eles três no gênero *Burkholderia* referentes aos sideróforos denominados ornibactinas C4, C6 e C8 (AGNOLI et al., 2006).

Compostos produzidos por *Burkholderia* e que tem demonstrado atividade antifúngica incluem cepacinas (LLOYD et al., 1984); cepacidinas (LIM et al., 1994); pirrolnitrina (MENDES et al., 2007; SCHIMIDT et al., 2009); ornibactina (sideróforo) (AGNOLI et al., 2006); glidobactinas (SCHELLENBERG et al., 2007) entre outros (VIAL et al. 2007), sendo a maioria deles identificados em espécies pertencentes ao complexo cepacia. Esse cenário revela o grande potencial a ser explorado dentro do gênero *Burkholderia* quanto a identificação de compostos, principalmente peptídeos, com atividade antibacteriana.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas foram obtidas de cana-de-açúcar e pertencem à coleção de linhagens do Lab. Genética de Micro-organismos “João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, ESALQ/USP. Estas bactérias foram isoladas por Marcon (2007) e Rossetto (2008) durante o desenvolvimento do projeto: “Interação entre populações microbianas e Plantas Geneticamente Modificadas”. (Processo FAPESP 02/14143-3 Coordenador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo). Foram avaliadas 34 linhagens, sendo 17 endofíticas de raiz e 17 da rizosfera de cana-de-açúcar (Tabela 1). Estas linhagens foram previamente caracterizadas por Mendes et al. (2007) e Luvizotto et al. (2010).

Como bactérias indicadoras foram utilizadas as espécies descritas na Tabela 2. As bactérias foram cultivadas por 48 horas em meios de cultura e temperaturas apropriados a cada linhagem bacteriana.

Tabela 1 - Código de estoque e local de isolamento das linhagens de *Burkholderia* spp. avaliadas neste estudo

(continua)

Número de linhagens	Código	Local de isolamento
1	TH4.4.3F1	Rizosfera
2	TC4.3.1F2	Rizosfera
3	CV4.4.2F2	Rizosfera
4	CV3.2.3F2	Rizosfera
5	TC2.2.2F5	Rizosfera
6	CV2.2.2F2	Rizosfera
7	CV3.1.2F4	Rizosfera
8	TC3.3.3F1	Rizosfera
9	CV2.3.2F1	Rizosfera
10	TH3.1.3F3	Rizosfera
11	TH2.3.2F5	Rizosfera
12	ESR73	Rizosfera

Tabela 1 - Código de estoque e local de isolamento das linhagens de *Burkholderia* spp. avaliadas neste estudo

(conclusão)

Número de linhagens	Código	Local de isolamento
13	TC2.2.2F4	Rizosfera
14	CV2.1.2R2	Rizosfera
15	CV2.1.3F5	Rizosfera
16	TH2.3.3R3	Rizosfera
17	TC3.3.1F1	Rizosfera
18	CV3.1.1F1	Endofítico raiz
19	TC3.4.1F4	Endofítico raiz
20	CV3.2.2F5	Endofítico raiz
21	TH3.1.1R4	Endofítico raiz
22	ESR63	Endofítico raiz
23	CV2.4.3R2	Endofítico raiz
24	TC3.4.2R2	Endofítico raiz
25	TC3.3.1R6	Endofítico raiz
26	TC3.4.2R3	Endofítico raiz
27	TH3.4.1R4	Endofítico raiz
28	TC3.4.1R1	Endofítico raiz
29	TH2.3.3R4	Endofítico raiz
30	TC3.4.1F2	Endofítico raiz
31	TC3.4.2R1	Endofítico raiz
32	TH2.2.3R3	Endofítico raiz
33	TH2.1.3R2	Endofítico raiz
34	TH2.4.1R1	Endofítico raiz

Tabela 2 - Linhagens bacterianas utilizadas como indicadoras da atividade antibacteriana em linhagens do gênero *Burkholderia*

Isolado	Espécie/Gênero	Hábito	Hospedeiro/Habitat	Referência
CV2.1.3F5	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Endófito	Cana-de-açúcar	Marcon, 2007; Rossetto, 2008; Luvizotto, 2010
TC3.4.1R1	<i>Burkholderia sp</i>	Endófito	Cana-de-açúcar	Marcon, 2007; Rossetto, 2008; Luvizotto, 2010
EF 1/6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Endófito	Laranja doce	Araujo et al., 2002; Belmonte, 2009
ESR94	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Endófito	Cana-de-açúcar	Mendes, 2008
ATCC 25992	<i>Escherichia coli</i>	Patógeno	Homem	Coleção do Laboratório de Genética de micro-organismos "Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo"
ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i>	Saprófito	Solo	Coleção do Laboratório de Genética de micro-organismos "Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo"
Cepa padrão	<i>Xanthomonas albilineans</i>	Fitopatógeno	Cana-de-açúcar	Coleção do Laboratório de Genética de micro-organismos "Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo"
T-1717	<i>X. campestris pv. vesicatoria</i>	Fitopatógeno	Tomate	Coleção Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, UNESP/Botucatu-SP
MAM 2763F	<i>X. axonopodis pv. manihotis</i>	Fitopatógeno	Mandioca	Coleção Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, UNESP/Botucatu-SP
Mand 2077	<i>X. axonopodis pv. manihotis</i>	Fitopatógeno	Mandioca	Coleção Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, UNESP/Botucatu-SP
UFLA3	<i>X. axonopodis pv. phaseoli</i>	Fitopatógeno	Feijoeiro	Coleção Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, UNESP/Botucatu-SP
Couve1	<i>X. campestris pv. campestris</i>	Fitopatógeno	Couve manteiga	Coleção Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, UNESP/Botucatu-SP
Feij-2634	<i>C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i>	Fitopatógeno	Feijoeiro	Maringoni, Kurozawa, 2002
110905.8	<i>X. axonopodis pv. phaseoli</i>	Fitopatógeno	Feijoeiro	Instituto Agronômico de Campinas, IAC/SP

2.2.2 Atividade antibacteriana de linhagens de *Burkholderia* spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar

2.2.2.1 Método da sobrecamada (*spot-on-the-lawn*)

Os ensaios de antagonismo bacteriano foram conduzidos utilizando o método da sobrecamada (PUGSLEY, OUDEGA, 1987; GROSS, VIDAVER, 1990). As linhagens de *Burkholderia* foram cultivadas em meio líquido Luria Bertani-LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) por 48 horas a 28 °C. Após o crescimento, alíquotas de 10 µl foram gotejadas em placas de petri contendo meio TSB 5% e incubadas por 48 horas a 28 °C. Posteriormente as células foram inativadas por exposição ao vapor de clorofórmio por 40 minutos e em seguida, uma sobrecamada de 5 ml de meio de cultura semi-sólido fundente (0,8%), contendo 50 µl de cultura de bactéria indicadora (10⁸ UFC/ml), foi adicionada sobre as colônias inativadas.

As culturas foram novamente incubadas por 24-48 horas em temperatura ótima para as bactérias indicadoras e após a incubação a presença de atividade antibacteriana foi confirmada pela formação de um halo claro de inibição de pelo menos 2 mm de diâmetro ao redor da colônia da bactéria testada.

Todos os experimentos foram realizados em quadriplicata sendo que em cada repetição a disposição das linhagens nas placas foi alterada de forma a eliminar a possível interferência entre uma linhagem e outra na produção de substâncias antibacterianas.

2.2.3 Fatores de interferência na atividade antibacteriana

Para as linhagens capazes de exibir atividade antagonista frente a três ou mais bactérias indicadoras foi realizada a avaliação de fatores de interferência nessa atividade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a bactéria indicadora utilizada foi a linhagem de *C. flaccumfaciens* EF 1/6.

2.2.3.1 Exclusão da ação de bacteriófagos

A partir das placas que induziram a formação de um halo de inibição no teste *spot-on-the-lawn* foi realizado um corte no ágar ao redor do halo, sendo este ágar adicionado a 3 ml de caldo Luria Bertani-LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), triturado com um bastão de vidro estéril e mantido à temperatura ambiente durante 60 minutos. Depois, foi adicionado 100 µl dessa suspensão e 100 µl da cultura indicadora a 8 ml de meio de cultura semi-sólido, que posteriormente foi distribuído homogeneamente sobre uma placa de meio TSB 5% e incubadas durante 48 horas a 28°C. A observação de zonas de lise é indicativa da presença de bacteriófagos líticos (LEWUS, MONTVILLE, 1991).

2.2.3.2 Influência do meio de cultura na atividade antibacteriana

Para avaliar a influência da composição do meio de cultura no antagonismo as linhagens de *Burkholderia* foram avaliadas nos meios TSB 5% (por litro: 1,5 g; pH 7,3); triptona de soja TSA 10% (por litro: 4 g; pH 7,0); LB (por litro: triptona 10 g; NaCl 10 g; Extrato de levedura 5 g; pH 7); M3 (por litro: Bacto peptona 4 g; triptona 1 g; extrato de malte 2,4 g; sacarose 1,2 g; K₂HPO₄ 1,2 g; KHPO₄ 1 g; MgSO₄; glutamina 0,4 g; histidina 0,2 g; pH 6,6) e MM (por litro: K₂HPO₄ 10,5 g; KHPO₄ 4,5 g; citrato de sódio 0,47 g; MgSO₄.7H₂O 0,25 g; [NH₄] 3SO₄ 10 g; triptona 15 g; glicose 0,2 g; pH 7,0). Foi utilizado o Método da sobrecamada (*spot-on-the-lawn*) descrito no item 2.2.2.1.

2.2.3.3 Avaliação da estabilidade térmica

A avaliação da sensibilidade da atividade antibacteriana ao calor foi determinada pela exposição das culturas por 48 horas e tratadas com vapor de clorofórmio, em forno a 80°C por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente por 30 minutos foi aplicada uma sobrecamada de 5 ml de meio de cultura semi-sólido fundente (0,8%), contendo 50 µl de cultura de bactéria indicadora (~10⁸ UFC/ml).

2.2.3.4 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

A sensibilidade a enzimas proteolíticas foi testada gotejando 50 µl de tripsina (1 mg/ml); próximos à colônia produtora, em culturas que haviam sido previamente incubadas e tratadas com vapor de clorofórmio. Em seguida uma sobrecamada de bactéria indicadora ($\sim 10^8$ UFC/ml) foi adicionada como descrito anteriormente. Em todos os casos as culturas tratadas foram examinadas após 48 horas de incubação e os diâmetros da zona de inibição foram comparados ao controle.

2.2.4 Obtenção e avaliação de fatores de interferência na atividade antibacteriana do extrato cru

Foi obtido o extrato cru para as linhagens TC3.4.2R3 e TH2.2.3R3 de *Burkholderia*. Para isso, estas linhagens foram incubadas por 48 horas em 300 ml de meio líquido TSB 5% sob agitação (200 rpm). Após o crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada por 15 minutos a 14000 x g. Os sobrenadantes foram filtrados a vácuo em membrana de poro 0,22 µm, e liofilizados nas condições: 0.04 mbar, -50°C, 5 dias em liofilizador Christ modelo Alpha 1-2 LD Plus. Os liofilizados foram ressuspensos em 2 ml de água destilada esterilizada e armazenados a -20°C, até o momento da utilização.

2.2.4.1 Método de difusão em ágar

Para a avaliação da atividade antibacteriana nos extratos crus foi utilizado o método de difusão em ágar. Para isso, a cultura bacteriana indicadora foi incubada por 24 horas em meio LB líquido. Após o crescimento, 100 µl da cultura bacteriana indicadora ($\sim 10^8$ UFC/ml) foi adicionada a 20 ml de meio de cultura semi-sólido fundente (0,8%) e transferido para placa de Petri. Após a solidificação do ágar foram gotejados sobre a placa 20 µl do extrato cru. Antes da incubação, as placas foram refrigeradas a 4°C por 4 horas para permitir a difusão radial dos compostos contidos no extrato. As placas foram incubadas por 24-48 horas a 28°C. A presença de atividade

inibitória foi confirmada pela formação de um halo claro de inibição no local da inoculação do extrato (LEWUS, MONTVILLE, 1991).

2.2.4.2 Definição de unidade arbitrária no extrato cru (BAREFOOT, KLAENHAMMER, 1983)

A atividade de cada extrato cru foi determinada utilizando o método de diluição seriada. Os extratos crus foram diluídos sucessivamente (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512) em placas de microtitulação a partir da proporção 1:1 em água destilada esterilizada. Para a avaliação da atividade inibitória presente em cada diluição foi utilizado o método de difusão em ágar descrito no item 2.2.4.2. (LEWUS, MONTVILLE, 1991). O título designado UA/ml foi definido como sendo a recíproca da última diluição que apresentou uma clara zona de inibição.

2.2.4.3 Avaliação da estabilidade térmica do extrato cru (OLIVEIRA, 1992; ROSA et al., 2002)

Diferentes microtubos contendo um volume de 200 µl do extrato cru foram incubados nas seguintes temperaturas: 37°C (1 h); 42°C (1 h); 65°C (30 minutos), 80°C (30 minutos), 100°C (15 minutos) e 121°C (20 minutos em autoclave). Foram realizados paralelamente, controles sem tratamento térmico.

2.2.4.4 Avaliação da sensibilidade do extrato cru a diferentes pHs (ROSA et al., 2002; LISBOA et al., 2006; KABUKI et al., 2007)

Para determinar a estabilidade ao pH, 200 µl de cada extrato cru foi submetido ao ajuste do pH entre 3-11 utilizando soluções diluídas de HCl e NaOH (1 M NaOH ou 1 M HCl). Cada fração foi incubada por 2 horas a 28°C. Após a incubação cada amostra teve seu pH ajustado para 6,5 e a atividade antibacteriana foi avaliada conforme descrito em 2.2.4.2. Foram realizados paralelamente, controles sem tratamento.

2.2.4.5 Avaliação da sensibilidade enzimática do extrato cru (BONINI , MARINGONI, NETO, 2007)

Para avaliar a estabilidade da atividade antibacteriana frente a enzimas foram utilizadas: tripsina, pronase E, proteinase K, lisozima e DNase (1 mg/ml). Alíquotas de 200 µl do extrato cru foram separadamente tratadas com as diferentes enzimas por 2 horas a 28°C. Após o tratamento as amostras foram fervidas por 2 minutos para inativação das enzimas e depois avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana conforme descrito em 2.2.4.2. Como controle, o extrato cru não foi tratado com nenhuma enzima.

2.2.5 Precipitação fracionada com sulfato de amônia (ROSA et al., 2002; HE et al., 2006)

Para avaliar a produção de substâncias com atividade antibacteriana de natureza protéica o sobrenadante das linhagens de *Burkholderia* TC3.4.2R3 e TH2.2.3R3 foram submetidos a precipitação fracionada com sulfato de amônia pela sua capacidade de alterar as características estruturais das proteínas fazendo com que as mesmas percam a solubilidade e precipitem. Culturas frescas de ambas as linhagens foram cultivadas em 100 ml de meio líquido Luria Bertani-LB a 28°C por 48 horas sob agitação (200 rpm). Após o crescimento, as células foram removidas por centrifugação do meio líquido a 14 000 × g por 15 minutos e posterior filtração a vácuo em membrana de poro 0,22 µm. Foram testados os seguintes intervalos de saturação 0-20% (m/m), 20-40% (m/m), 40-60% (m/m), 60-80% (m/m). A etapa de precipitação dos sobrenadantes teve início com a adição lenta de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] a 100 ml de sobrenadante bruto, sob agitação, em banho de gelo, até atingir a concentração de 20% por tempo mínimo de 30 minutos ou até que todo o sulfato de amônia fosse dissolvido. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14 000 x g por 30 minutos e o *pellet* foi separado do sobrenadante e ressuspenso em 1 ml de tampão fosfato de sódio 20 mmol com pH=6.0. O sobrenadante foi recolocado em banho e gelo e foi adicionada a quantidade de sulfato de amônia para atingir 40% de saturação. O procedimento anterior foi

repetido para os demais intervalos de saturação. Nas diferentes frações a atividade antibacteriana foi quantificada em UA/ml (conforme item 2.2.4.2) e as zonas de inibição avaliadas e comparadas com a obtida utilizando o extrato cru.

2.2.5.1 Quantificação de proteínas no extrato cru e nas frações precipitadas com sulfato de amônia

Para a determinação da concentração de proteínas totais solúveis nos extratos crus e nas diferentes frações de precipitação com sulfato de amônia foi aplicado o método de Bradford (1976) utilizando-se o BSA (“*bovine serum albumin*”) como padrão. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.6 Ensaio de antagonismo, *in vitro*, contra bactérias fitopatogênicas

Para os ensaios de antagonismo foram utilizadas sete diferentes linhagens de bactérias fitopatogênicas (Tabela 2) que foram rotineiramente crescidas em meio LB. Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas em meio LB líquido a 28°C. Os ensaios foram realizados segundo a metodologia descrita no item 2.2.2.1.

2.2.7 Mutagênese por inserção aleatória utilizando transposon

2.2.7.1 Teste de sensibilidade a canamicina

As linhagens TC3.4.2R3; TH2.2.3R3 foram crescidas em meio líquido LB por 24h a 28°C e alíquotas de 100 µl de cada linhagem foram semeadas sobre meio LB suplementado com canamicina (50, 100, 150, 200, 300 ou 400 µg.ml⁻¹) e placa controle sem adição de antibiótico. O crescimento das linhagens foi monitorado por 48 horas e a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi escolhida para o experimento de transformação.

2.2.7.2 Mutagênese utilizando transposon

Burkholderia cenocepacia, linhagem TC3.4.2R3 foi transformada com o transposoma EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2>Tnp (Figura 1) que consiste em um complexo estável formado pela enzima transposase e o transposon Ez-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2> que contém uma origem de replicação condicional R6K γ e gene de resistência a canamicina (Tn903) funcional em *E. coli* e flanqueado por sequências de inserção invertidas de 19pb (Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA).

Culturas eletrocompetentes da linhagem TC3.4.2R3 foram obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 ml de meio líquido LB posteriormente incubado a 28°C por 18 horas sob agitação (200 rpm). Após o crescimento, 5 ml da cultura foi transferido para 250 ml de LB e incubados a 28°C sob agitação (200 rpm) até atingir a densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,7 medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). Em seguida a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em água deionizada esterilizada e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuscitado em glicerol 10% e centrifugado. O sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi ressuscitado em glicerol (DO_{600nm}) para a diluição de 500x e distribuído em alíquotas de 100 μ l que foram estocadas a -80°C. O transposoma (3,3 ng) foi adicionado a 100 μ l da cultura eletrocompetente e introduzido por eletroporação (Gene Pulser, BioRad - 2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubeta de 0,2 cm). Logo após a eletroporação, foi adicionado meio SOC na cubeta de eletroporação para um volume final de 1 ml, sendo pipetado gentilmente. O conteúdo da cubeta foi transferido para um microtubo e incubado a 28°C sob agitação (200 rpm) durante 1 hora. Após esse período alíquotas de 100 μ l das células submetidas a eletroporação sem diluição e diluídas na proporção 1:10 e 1:100 foram semeadas separadamente em meio LB suplementado com canamicina (200 μ g/ml). Colônias resistentes a canamicina indicaram que ocorreu a integração do transposon no genoma e, portanto foram isoladas e estocadas a -80°C.

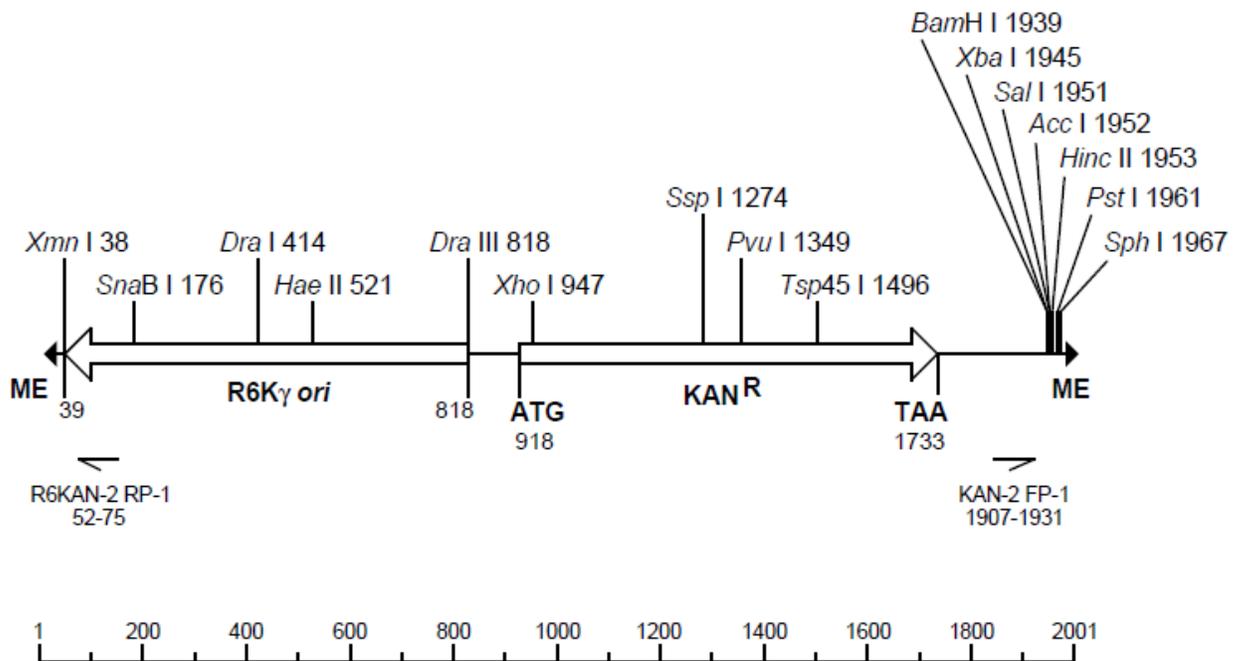


Figura 1 - Transposon EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2>Tnp utilizado para mutagênese aleatória. O transposon EZ-Tn5 <R6K γ ori/KAN-2> forma um complexo estável com a enzima transposase EZ-Tn5, contém uma origem de replicação condicional (R6K γ ori) e gene de resistência a canamicina (Tn903) que são funcionais em *E. coli*, flanqueados por sequências de reconhecimento (ME) da EZ-Tn-5 Transposase (Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA)

2.2.7.3 Seleção quanto à alteração na atividade de antagonismo bacteriano

Os transformantes obtidos tiveram sua atividade antagonista contra bactérias avaliada pelo Método da sobrecamada (item 2.2.2.1), para isso foi utilizada a bactéria *X. albilineans* como linhagem teste. Posteriormente, os mutantes que apresentaram atividade antibacteriana modificada frente a *X. albilineans* foram selecionados para os experimentos posteriores onde também foram avaliados frente a *C. flaccumfaciens* EF 1/6, *X. albilineans*, *E. coli*, *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA3.

2.2.7.3.1 Confirmação da transformação por PCR

(WANG et al., 2009)

O DNA genômico da linhagem selvagem e de doze transformantes foi extraído utilizando DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). A confirmação da transformação foi

realizada por meio da amplificação de uma região presente no transposon. A análise de PCR foi conduzida utilizando os primers Tn5F (5'-ATTCAACGGGAAACGTCTTG-3') e Tn5R (5'-ACTGAATCCGGTGAGAATGG-3') para obtenção de um fragmento de 569pb. A reação de PCR (25 µl) continha 100ng de DNA, 1 x PCR buffer, 0,5 mM dNTPs, 0,2 µM de cada primer e 1,0 U Taq polimerase. As reações foram aquecidas a 95°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos.

2.2.7.3.2 Análise de *Southern Blot* (SAMBROOK et al., 1989)

A análise de *Southern Blot* foi realizada para a verificação da aleatoriedade e o número das inserções do transposon no cromossomo da linhagem de *Burkholderia cenocepacia* TC3.4.2R3. Para isso, realizaram-se os seguintes procedimentos:

a) Transformação de *E. coli* DH5 α -*pir* (KOLTER, INUZUKA, HELINSKI, 1978):

Com a finalidade de obter o controle positivo e a sonda o complexo transposoma EZ-Tn5<R6Kygori/KAN-2>Tnp foi inserido em *E. coli* DH5 α -*pir* utilizando o procedimento descrito em 2.2.7.2. Posteriormente, uma colônia de *E. coli* DH5 α -*pir*.Tn5 foi semeada em 10 ml de meio LB suplementado de canamicina (50 µg/ml) a 37°C por 18 horas sob agitação (200 rpm) e o transposon foi extraído utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

b) Extração de DNA bacteriano, Restrição do DNA genômico e transferência para membrana de náilon:

As reações de restrição em um volume total de 250 µl, contendo 7,5 µg de DNA bacteriano ou 250ng do transposon, 25 µl de tampão React[®] 3 10X e 40U da enzima *EcoRI* foram incubadas a 37°C por 12 horas. Para concentrar o DNA foi realizada uma precipitação adicionando 25 µl de acetato de amônio (7,8 M) e 625 µl de álcool absoluto. Após incubação a -20°C por 12 horas, o material foi centrifugado (10.000 g

por 40 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e adicionados 700 µl de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos (10.000 g a 4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado seco a 37°C. Após a secagem, o DNA hidrolisado foi ressuspensionado em 32 µl de TE e 8 µl de sacarose 40%. Os 40 µl de DNA foram aplicados em gel de agarose 1% adicionado de brometo de etídio (1,0 mg.ml⁻¹), e a eletroforese foi realizada a 35 V.cm⁻¹ e após a mesma o gel foi fotodocumentado. Foi utilizado como marcador de peso molecular 40 µl do DNA Ladder 1 Kb (0,2 µg.µl⁻¹) (Fermentas). O gel de agarose contendo o DNA foi incubado em 500 ml de solução de HCl 0,25 M por 10 minutos para depurinização. Após esse período, o gel foi lavado com água destilada e transferido para 500 ml de solução de NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M por 30 minutos para desnaturação. O gel foi lavado novamente com água destilada e em seguida incubado por 15 minutos em 250 ml de solução neutralizadora (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M; EDTA 1 mM, pH 7,5), com agitação branda a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido novamente. O DNA contido no gel foi transferido por capilaridade para uma membrana de náilon (Hybond-N+, GE HealthCare), sendo utilizada a solução de transferência SSC 20X (Na Cl 3 M; citrato de sódio 0,3 M; pH 7,0). O DNA foi fixado em membrana por aquecimento a 80°C por 2 horas e então armazenado a temperatura ambiente.

c) Preparo da sonda e hibridação molecular:

Para a hibridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo uma região do transposon. Para a obtenção do fragmento o transposon foi extraído de células de *E. coli* DH5α-*pir*:Tn5 (QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN) e submetido a PCR com os primers Tn5F (5'-ATTCAACGGGAAACGTCTTG-3') e Tn5R (5'-ACTGAATCCGGTGAGAATGG-3') e purificado utilizando UltraClean™ PCR Clean – up Kit (MOBIO Laboratories). A marcação da sonda e hibridação da membrana foram realizadas utilizando o sistema de fosfatase alcalina termoestável (Amersham AlkPhos Direct™ Labeling and and Detection Systems, GE HealthCare), a 55°C segundo as recomendações do fabricante. Todos os passos de hibridização foram realizados no forno de hibridação Hybridiser HB-2D (Techne). Após a hibridação a membrana foi

lavada com tampão SSC (20x: NaCl, 3 M; citrato de sódio, 0,3 M; água MilliQ, 500 ml; pH 7) e documentada por autoradiografia.

2.2.7.4 Clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o transposon

2.2.7.4.1 Extração de DNA bacteriano

O DNA genômico dos transformantes foi extraído pelo método fenol-clorofórmio. Para isso, os clones foram crescidos em 5 ml de meio LB suplementado com 200 µg/ml de canamicina a 28°C por 18 horas sob agitação (200 rpm). As culturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e o precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de tampão TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 7,0) seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. O precipitado foi novamente ressuspensionado em 500 µl de tampão de lise, 0,5 g de sílica (0.1 mm) e 60 µl de SDS 10%. Em seguida a suspensão foi agitada por 1 minutos no vortex, incubada em banho seco a 80°C por 10 minutos, adicionada de 500 µl de fenol saturado e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionados 200 µl de fenol e 200 µl de clorofórmio, a suspensão foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo sendo então adicionados 0,1 do volume de NaCl 5 M e 0,6 do volume de isopropanol. A mistura foi mantida por 10 minutos a -20°C e centrifugada por 10 minutos. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuspensionado em 10 µl de água deionizada esterilizada. A concentração e a integridade dos DNAs extraídos foram verificadas em gel de agarose 1,0% a 100 volts.cm⁻¹ utilizando como padrão de comparação marcador Lambda (λ) (Fermentas), nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 ng/µl juntamente com o marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas).

2.2.7.4.2 Clonagem das regiões flanqueadoras do transposon

Com o objetivo de clonar as regiões flanqueadoras do transposon em *E. coli* DH5α-*pir*, os DNAs extraídos das linhagens transformantes (200ng/µl) foram tratados

separadamente com enzima de restrição *EcoRI* por 12 horas a 37 °C e posteriormente, os DNAs clivados foram concentrados adicionando 25 µl de acetato de amônio (7,8 M) e 625 µl de álcool absoluto seguido de incubação a -20 °C por 12 horas. Em seguida o material foi centrifugado (10.000 g por 40 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi descartado e adicionados 700 µl de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos (10.000 g a 4 °C). O sobrenadante foi novamente descartado, o precipitado seco a 37 °C e ressuspendido em 7,5 µl de água destilada esterilizada.

Os fragmentos obtidos da digestão foram circularizados com o kit Fast-Link™ DNA Ligation Kit (EPICENTRE, Madison, Wisconsin), durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminada a reação, a enzima Fast-Link™ DNA ligase foi inativada por aquecimento a 70 °C durante 10 minutos. O transposon EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp, não necessita de vetores de clonagem, pois sua sequência apresenta uma marca de resistência a canamicina (Tn903), permitindo a seleção de colônias transformadas, e também uma origem de replicação R6Kγori, o que impede que o transposon seja integrado no genoma hospedeiro e o mesmo seja replicado de forma autônoma no citoplasma da célula. O produto da ligação (2 µl) foi introduzido por eletroporação (Gene Pulser BioRad, 2,5Kv, 25 µF, 400Ω, cubetas de 0,2cm) em células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α-*pir*. Após a eletroporação as células de *E. coli* DH5α-*pir* eletrocompetentes foram imediatamente transferidas para microtubos com meio líquido LB para um volume final de 1 ml, e incubadas a 37 °C durante 60 minutos, sob agitação para facilitar o crescimento celular. Cem microlitros (sem diluição e diluições de 1:10 e 1:100) da reação foram semeados em meio LB sólido contendo 50 µg/ml de canamicina. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e após o período de crescimento, clones que continham o produto de ligação e expressavam o gene de resistência a canamicina foram selecionados através do crescimento em meio de cultura contendo o antibiótico (50 µg/ml) e em seguida armazenados em meio LB líquido contendo 20% de glicerol a -80 °C.

2.2.7.5 Sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon

Para a identificação das sequências de DNA dos genes interrompidos pelo transposon, o DNA plasmidial contendo o transposon foi extraído de células de *E. coli* DH5 α -*pir* (QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN) e o sequenciamento foi realizado a jusante e a montante utilizando os primers que anelam nas extremidades do transposon EZ-Tn5 <R6K γ gori/KAN-2>KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e R6KAN-2 RP-1 (5'-CTACCCTGTGGAACACCTACATCT-3'). Foram selecionados dois clones de cada evento de clonagem e os mesmos foram sequenciados em duplicata a jusante e a montante totalizando oito sequências que posteriormente foram alinhadas para a obtenção de uma única sequência consenso com o auxílio do software CodonCode Aligner 3.5 (CodonCode Corporation, 2.2.7.6 Dedham, MA, EUA). As sequências flanqueadoras obtidas foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST (Blastn, Blastx) contra a base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências também foram analisadas quanto a presença de ORFs (*open reading frames*) com auxílio da ferramenta ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atividade antibacteriana de linhagens de *Burkholderia* spp. endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar

No presente trabalho, 34 linhagens de *Burkholderia* spp. obtidas da rizosfera e endofiticamente de raízes de cana-de-açúcar, foram avaliadas *in vitro* quanto à capacidade de produzir substâncias antibacterianas contra *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia* spp., *P. fluorescens*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. flaccumfaciens* e *X. albilineans* (Tabela 3). A atividade antibacteriana foi evidenciada pela presença de zonas claras de inibição ao redor da linhagem produtora (Figura 2). Todas as linhagens avaliadas foram capazes de exibir ação antagonista frente a pelo menos uma bactéria indicadora. Sete linhagens (20,6%) foram capazes de inibir duas bactérias indicadoras e vinte linhagens (58,8%), três ou mais bactérias indicadoras, mostrando que a maior parte das linhagens apresenta um amplo espectro de inibição visto que são capazes de inibir bactérias Gram negativas, do Filo Proteobacteria, das classes β (*Burkholderia*) e γ (*P. fluorescens* e *X. albilineans*) Proteobacteria, e bactérias Gram positivas pertencentes aos Filo Firmicutes (*B. subtilis*) e Actinobacteria (*C. flaccumfaciens*).

Tabela 3 - Porcentagem de inibição e intervalo dos diâmetros da zona de inibição frente às bactérias indicadoras

Bactéria indicadora	% de inibição	Intervalo dos diâmetros da zona de inibição (mm)
<i>Burkholderia cenocepacia</i> CV2.1.3F5	26,5	2 - 4
<i>Burkholderia</i> sp. TC3.4.1R1	35,3	2 - 4
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	50,0	7 - 30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	97,1	2 - 25
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ESR94	55,8	7 - 40
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> EF 1/6	61,8	11 - 50
<i>Xanthomonas albilineans</i>	100,0	9 - 40

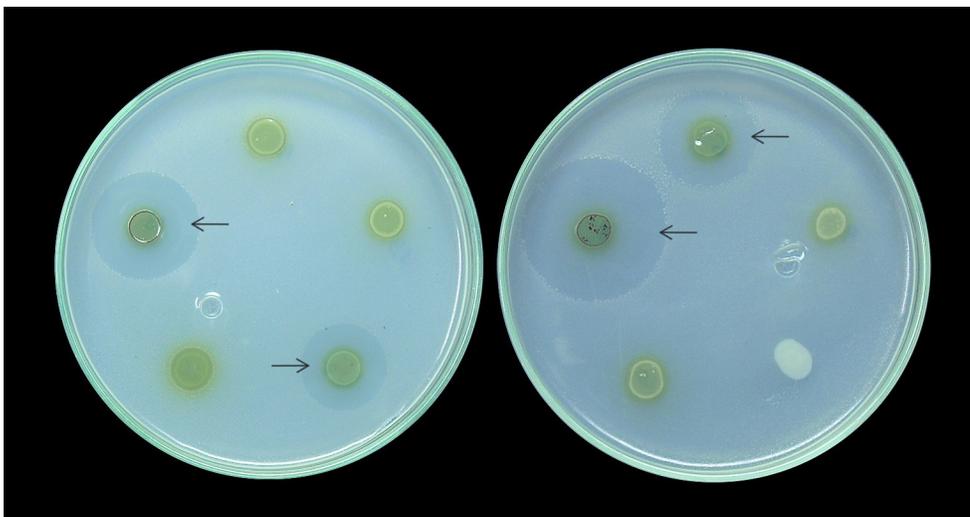


Figura 2 - Zonas de inibição de linhagens de *Burkholderia* spp. frente a bactéria indicadora *P. fluorescens*. As setas indicam os halos de inibição

Foi observado que os halos de inibição apresentaram variação de acordo com a bactéria indicadora utilizada, variando de 2 a 50 mm a partir das margens da colônia produtora. Este resultado evidencia diferença quanto à sensibilidade das bactérias indicadoras ou que *Burkholderia* pode produzir mais de um tipo de composto com atividade antibacteriana. Dentre as indicadoras *C. flaccumfaciens* se mostrou mais sensível, apresentando os maiores halos de inibição (Tabelas 3 e 4).

A presença de diferentes perfis fenotípicos (Tabela 4) com base na atividade antibacteriana também sugere a produção de diferentes metabólitos secundários pelas linhagens avaliadas conforme evidenciado pelo espectro variado de atividade inibitória. Essa constatação demonstra a importância da avaliação de diferentes linhagens em programas de seleção (*screening*) de metabólitos secundários garantindo o acesso ao maior número de informações possíveis sobre determinado gênero, espécie ou grupo taxonômico.

No ensaio de atividade antibacteriana contra *X. albilineans* todas as linhagens apresentaram a capacidade de inibir esse importante patógeno de cana-de-açúcar, sendo que o diâmetro da zona de inibição variou de 9 a 40mm. A atividade antagonista, *in vitro* e *in planta*, de espécies de *Burkholderia* pertencentes ao complexo cepacia já foi demonstrada contra fungos fitopatogênicos como por exemplo *Rhizoctonia solani* em algodão (ZAKI, MISAGHI, HEYDARI, 1998); *Pythium aphanidermatum* em ervilhas

Tabela 4 - Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas e da rizosfera pertencentes ao gênero *Burkholderia* pelo método de sobre-camada (continua)

Código das linhagens	Gene 16S rDNA (Acesso NCBI)	Antagonismo a					
		<i>B. cenocepacia</i> CV2.1.3F5	<i>Burkholderia</i> sp. TC3.4.1R1	<i>P. fluorescens</i> ESR94	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. flaccumfaciens</i> EF 1/6	<i>E. coli</i> ATCC 25992
TH4.4.3F1 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	-	-	-	-	+
TC4.3.1F2 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	+	-	-	+	-	+
CV4.4.2F2 ^(H)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	+	-	-	-	-	+
CV3.2.3F2 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	+	-	+	++	++	++
TC2.2.2F5 ^(R)	<i>Burkholderia cepacia</i> (EF54874.1)	-	+	++	+++	+++	++
CV2.2.2F2 ^(R)	<i>Burkholderia</i> sp. (EF602559.1)	-	-	-	-	-	+
CV3.1.2F4 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	-	-	-	-	+
TC3.3.3F1 ^(R)	<i>Burkholderia</i> sp. (EF602560.1)	+	+	++	+++	+++	++
CV2.3.2F1 ^(R)	<i>Burkholderia</i> sp. (EF602562.1)	-	-	++	+++	+++	++
TH3.1.3F3 ^(H)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	-	++	+++	+++	+
TH2.3.2F5 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602565.1)	-	-	+++	+++	+++	++
ESR73 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602559.1)	+	-	+	-	-	+
TC2.2.2F4 ^(R)	<i>Burkholderia</i> sp. (DQ813317.1)	-	-	++	-	++	++
CV2.1.2R2 ^(H)	<i>Burkholderia anthina</i> (AY86373.1)	-	-	-	-	-	+
CV2.1.3F5 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	-	+	+	++	++
TH2.3.3R3 ^(R)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	+	-	-	-	+
TC3.3.1F1 ^(R)	<i>Burkholderia cepacia</i> (DQ846736.1)	+	-	-	++	+++	++

^(R) e ^(H): Origem da linhagem - Rizosférica e Endofítica de raiz, respectivamente;

-, sem inibição; +, zona de inibição 2-10 mm; ++, zona de inibição 11-20 mm; +++, zona de inibição 21-30 mm; e +++++, zona de inibição 31-50mm.

Tabela 4 - Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas e da rizosfera pertencentes ao gênero *Burkholderia* pelo método de sobrecamada (conclusão)

Código das linhagens	Gene 16S rDNA (Acesso NCBI)	Antagonismo a					
		<i>B. cenocepacia</i> CV2.1.3F5	<i>Burkholderia</i> sp. TC3.4.1R1	<i>P. fluorescens</i> ESR94	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. flaccumfaciens</i> EF 1/6	<i>E. coli</i> ATCC 25992
CV3.1.1F1 ^(E)	<i>Burkholderia</i> sp. (DQ977698.1)	+	-	-	-	-	+
TC3.4.1F4 ^(E)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	+	+++	+++	++++	+++
CV3.2.2F5 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AB272341.1)	+	+	++	+++	++++	++
TH3.1.1R4 ^(E)	<i>Burkholderia</i> sp. (DQ094147.1)	-	-	+	-	++	+
ESR63 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (EF602558)	-	+	++	+++	++++	++
CV2.4.3R2 ^(E)	<i>Burkholderia</i> sp. (EF602562.1)	-	-	-	-	-	+
TC3.4.2R2 ^(E)	<i>Burkholderia</i> sp. (AB298718.1)	-	+	-	-	++	-
TC3.3.1R6 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AB015606.1)	-	-	+++	+++	++++	+
TC3.4.2R3 ^(E)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602566.1)	-	+	++	-	++	+
TH3.4.1R4 ^(E)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	-	+	+	++	++
TC3.4.1R1 ^(E)	<i>Burkholderia</i> sp. (EF602562.1)	+	+	+++	+++	++++	+
TH2.3.3R4 ^(E)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (EF602567.1)	-	+	-	-	-	+
TC3.4.1F2 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY741351.1)	+	+	++	+++	+++	+++
TC3.4.2R1 ^(E)	<i>Burkholderia</i> sp. (AB298718.1)	+	+	++	++	+++	++
TH2.2.3R3 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY946011.1)	-	-	+++	+++	++++	++
TH2.1.3R2 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AF097532.1)	-	+	-	+	-	+
TH2.4.1R1 ^(E)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY946011.1)	-	+	-	-	-	+

^(E) e ^(F): Origem da linhagem - Rizosférica e Endofítica de raiz, respectivamente;

-, sem inibição; +, zona de inibição 2-10 mm; ++, zona de inibição 11-20 mm; +++, zona de inibição 21-30 mm; e ++++, zona de inibição 31-50mm.

(HEUNGENS, PARKE, 2001) mas poucos trabalhos têm avaliado o potencial de isolados endofíticos e da rizosfera de *Burkholderia* em inibir bactérias (LUVIZOTTO et al., 2010).

2.3.2 Fatores de interferência na atividade antibacteriana

A avaliação de fatores que podem interferir no antagonismo foi realizada para vinte linhagens de *Burkholderia* spp., que apresentaram maior espectro de inibição. Para avaliar se os halos de inibição poderiam ser causados pela ação de bacteriófagos foi utilizado protocolo padrão, o qual é capaz de discriminar se o halo de inibição é causado por bacteriocinas ou por bacteriófagos, os quais são capazes de produzir zonas líticas similares (BRADLEY, 1967). Não foi observada para nenhuma linhagem a formação de placas de lise, mostrando que o halo de inibição não está associado à presença de bacteriófagos líticos e sim a produção de outros compostos.

A atividade antagonista permaneceu estável para todas as linhagens avaliadas após exposição a 80°C/15min (Figura 3) e tratamento com a enzima proteolítica tripsina. Também foi observado que a composição do meio de cultura interferiu na atividade antagonista das linhagens avaliadas (Figura 4), sendo que todas as linhagens demonstraram atividade frente a *C. flaccumfaciens* EF1/6 nos meios TSB 5% e M3, mas exibiram preferência pelo meio TSB 5%. Dezesesseis (84,21%) linhagens não demonstraram atividade antagonista em meio mínimo; 6 linhagens (31,57%) em meio LB e 3 (15,79%) linhagens em TSA 10%. Estes resultados indicam a importância da composição do meio de cultura para a detecção de substâncias antimicrobianas.

2.3.3 Obtenção e avaliação de fatores de interferência na atividade antibacteriana do extrato cru

Foram obtidos os extratos crus para as linhagens, TC3.4.2R3; TH2.2.3R3, e os mesmos foram testados frente às bactérias indicadoras *C. flaccumfaciens* EF1/6 (Figura 5) e *X. albilineans* para as quais se mostraram ativos.

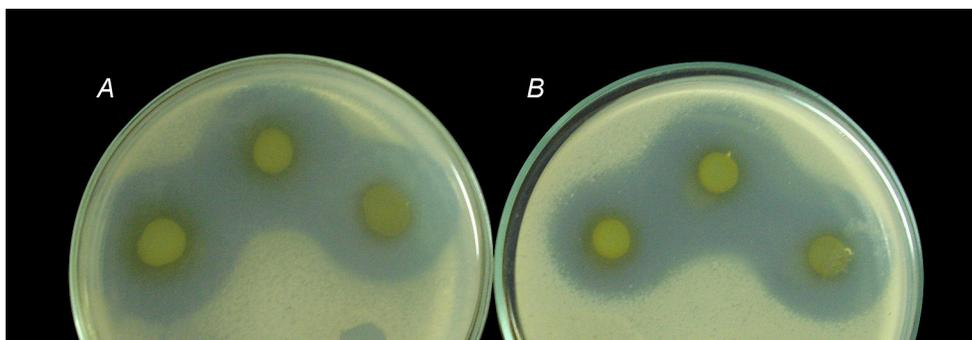


Figura 3 - Avaliação da estabilidade térmica a 80°C por 15 minutos (A): Controle; (B): após tratamento. (Bactéria indicadora: *C. flaccumfaciens* EF1/6)

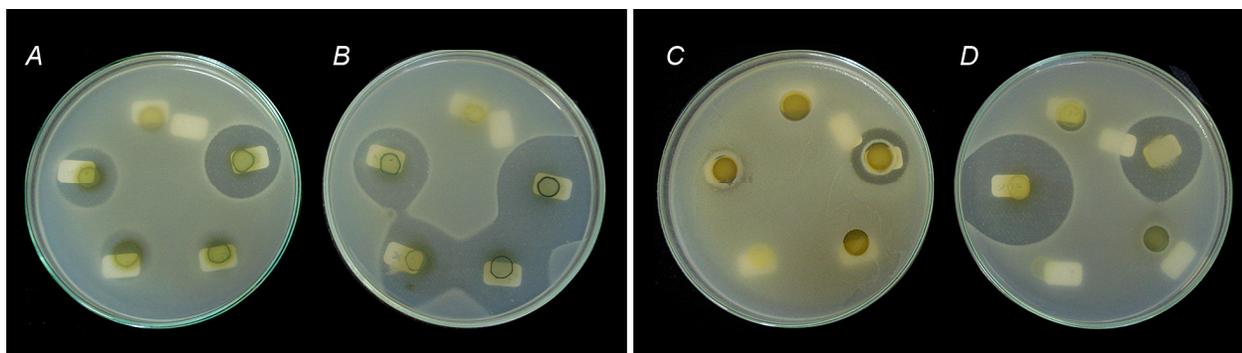


Figura 4 - Influência do meio de cultura no antagonismo de linhagens de *Burkholderia* spp. LB (A; C); TSA 10% (B; D) (Bactéria indicadora: *X. albilineans*)

A atividade antagonista dos extratos crus para ambas as linhagens permaneceu inalterada após tratamento com as enzimas tripsina, pronase E, proteinase K, lisozima e DNase. O mesmo ocorreu quando os extratos foram expostos aos binômios temperatura/tempo: 37°C/1h; 42°C/1h; 65°C/30 min, 80°C/30 min, 100°C/15min e 121°C/20min, sendo o mesmo observado após liofilização (-50°C) dos sobrenadantes e estocagem do extrato cru a -20°C pelo período de seis meses. Os efeitos antibacterianos também foram estáveis em pH ácido e básico (Figura 6). Resultados encontrados na literatura indicam que a sensibilidade a enzimas proteolíticas, a temperatura e ao pH são extremamente variáveis no que se refere aos peptídeos do tipo bacteriocina. Em uma bacteriocina de baixo peso molecular identificada em *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*, a atividade foi mantida após tratamento a 100°C/60min, além de ser estável às mesmas proteases utilizadas no presente estudo (SEO et al., 2004). Por outro lado, são descritas bacteriocinas termolábeis e sensíveis a

proteases (LISBOA et al., 2006; MAREKOVA et al., 2007) e outras sensíveis a proteases mas termoestáveis (KAMOUN et al., 2005).



Figura 5 - Atividade antibacteriana do extrato cru da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 frente à *C. flaccumfaciens* EF1/6 sem nenhum tratamento

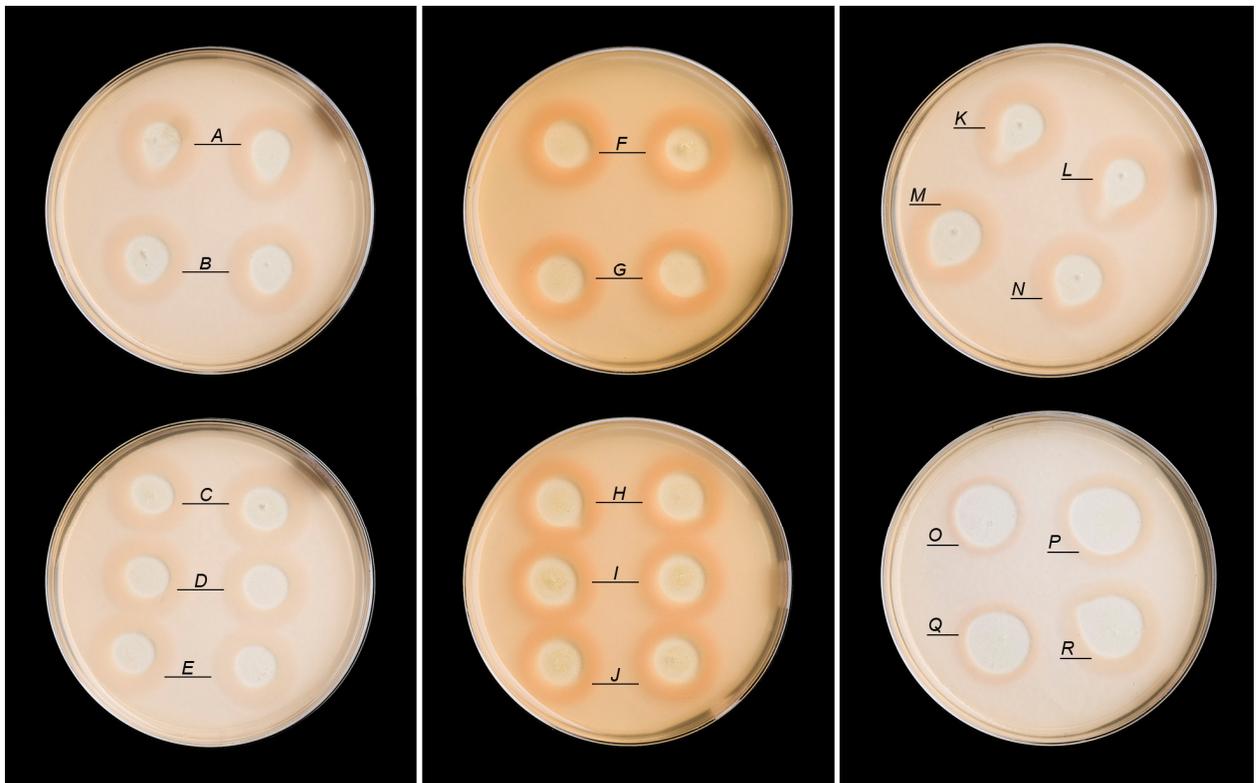


Figura 6 - Atividade antibacteriana do extrato cru da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 frente a *C. flaccumfaciens* EF1/6 após tratamento com enzimas proteolíticas (A: pronase E; B: DNase; C: lisozima; D: tripsina; E: proteinase K), após exposição a diferentes temperaturas (F: 37°C/1 h; G: 42°C/1 h; H: 65°C/30 min; I: 80°C/30 min; J: 100°C/15 min) e após exposição a diferentes valores de pH (K: pH = 3; L: pH = 4; M: pH = 5; N: pH = 6; O: pH = 8; P: pH = 9; Q: pH = 10; R: pH = 11)

A termoestabilidade é uma das principais características de bacteriocinas de baixo peso molecular provavelmente devido a padrões complexos de pontes dissulfeto intramoleculares os quais estabilizam a estrutura secundária pela redução do número de possíveis estruturas desdobradas (DERAZ et al., 2005). Mas convém ressaltar que a termoestabilidade não está restrita a pequenos peptídeos, conforme demonstrado para algumas bacteriocinas identificadas inicialmente no gênero *Pseudomonas* (MICHEL-BRIAND, BAYSSE, 2002), mas já identificadas em outros gêneros (GROSS, VIDAVER, 1978; DAMASKO et al., 2005) que possuem alto peso molecular e se assemelham a cauda de bacteriófagos.

2.3.4 Precipitação fracionada com sulfato de amônia

O processo de purificação de proteínas é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas. A escolha de um processo de purificação depende das características físico-químicas, das propriedades biológicas e da fonte da qual a proteína será purificada. As análises de cromatografia líquida de alta eficiência, por troca iônica, em camada delgada associadas a espectrofotometria de massas são os sistemas mais utilizados para a distinção de peptídeos e/ou proteínas (DERAZ et al., 2005; HE, CHEN, LIU, 2006), mas exigem a otimização do protocolo de purificação que envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, principalmente quando o composto não é conhecido. Durante a purificação não raramente ocorrem mudanças na conformação estrutural das proteínas que podem provocar desde pequenas alterações nas suas características físico-químicas até modificação ou perda de sua atividade biológica.

A primeira etapa de purificação de proteínas possui um menor poder de resolução, porém permite o tratamento de maior quantidade de material. Uma das estratégias utilizadas é a precipitação com grande concentração de sais inorgânicos, sendo o sulfato de amônia um agente precipitante amplamente utilizado nessa etapa inicial, pois apresenta a capacidade de precipitar irreversivelmente as proteínas sem

aumento considerável de temperatura, e a solução final não apresenta alta densidade facilitando a obtenção do precipitado protéico após centrifugação.

Portanto, no presente estudo o objetivo da precipitação com sulfato de amônia foi identificar o melhor intervalo de saturação para a concentração de peptídeos e/ou proteínas com atividade antibacteriana presentes no sobrenadante e preparar a amostra para futuras análises.

A precipitação fracionada com sulfato de amônia foi realizada com os sobrenadantes das linhagens TC3.4.2R3, TH2.2.3R3 e a atividade foi comparada com os extratos crus (Tabelas 5 e 6). Pode-se observar que para a linhagem TC3.4.2R3 os intervalos de saturação de 0-20% e 20-40% não apresentaram atividade antibacteriana. O rendimento para o precipitado da fração de 40-60% foi de 14,48% e apresentou a maior atividade específica (1851 UA/mg^{-1}) que é aproximadamente 48 vezes maior que a do sobrenadante bruto. Para o intervalo de 60-80% a atividade específica foi ligeiramente inferior (1628 UA/mg^{-1}) e é aproximadamente 43 vezes a do sobrenadante bruto mas o rendimento foi maior (32,93%) do que o obtido para o intervalo 40-60%.

Já para a linhagem TH2.2.3R3 a maior atividade específica foi obtida no intervalo de 40-60%, que representa aproximadamente 39 vezes a atividade do sobrenadante bruto e rendimento de 20,10%. No intervalo de 60-80% o rendimento foi maior (45,28%), mas a atividade específica foi inferior, 20 vezes superior a do sobrenadante bruto.

Tabela 5 - Dados da precipitação nas diferentes frações de saturação com sulfato de amônia e do extrato cru da linhagem de *Burkholderia cenocepacia* TC3.4.2R3

Fração	Volume (ml)	Proteína total (mg/ml)	Atividade (UA)/ml	Atividade específica (UA mg ⁻¹)	Rendimento (%)
Extrato cru	300	0,5594	21,33	38,13	100,00
0 - 20%	1	0,0515	0	0	9,21
20 - 40%	1	0,0947	0	0	16,93
40 - 60%	1	0,0810	150	1851	14,48
60 - 80%	1	0,1842	300	1628	32,93

Tabela 6 - Dados da precipitação nas diferentes frações de saturação com sulfato de amônia e do extrato cru da linhagem de *Burkholderia cepacia* TH2.2.3R3

Fração	Volume (ml)	Proteína total (mg/ml)	Atividade (UA)/ml	Atividade específica (UA mg ⁻¹)	Rendimento (%)
Extrato cru	300	0,4015	85,33	212,52	100,00
0 - 20%	1	0,0500	0	0	12,45
20 - 40%	1	0,0800	200	2500	19,92
40 - 60%	1	0,0967	800	8273	20,10
60 - 80%	1	0,1818	800	4400	45,28

A precipitação com sulfato de amônia representa a primeira etapa necessária a purificação de peptídeos ou proteínas. Os resultados sugerem que o melhor intervalo visando uma maior atividade específica e rendimento seria a precipitação em um intervalo de 40-80% e 20-80% para as linhagens TC3.4.2R3, TH2.2.3R3, respectivamente, sendo que resultados semelhantes tem sido obtidos por outros pesquisadores com o objetivo de purificar bacteriocinas (CHERIF et al., 2003; MAREKOVA, LAUKOVA, SKAUGE, 2007; HAMMAMI et al., 2009).

Esta análise preliminar demonstrou que os extratos precipitados com sulfato de amônia mantém a atividade antibacteriana contra as bactérias *C. flaccumfaciens* EF1/6 e *X. albilineans* testadas anteriormente indicando a presença de compostos de natureza protéica. Novas etapas de purificação utilizando análises cromatográficas e de espectrofotometria de massa deverão ser realizadas a fim de caracterizar os compostos bioativos produzidos por essas linhagens.

2.3.5 Ensaio de antagonismo, *in vitro*, contra bactérias fitopatogênicas

Visto que a capacidade de inibir *C. flaccumfaciens* e *X. albilineans* foi frequente entre as linhagens de *Burkholderia* avaliadas, esta atividade antibacteriana foi avaliada contra outras espécies fitopatogênicas pertencentes a esses dois gêneros.

As bactérias fitopatogênicas utilizadas foram *X. campestris* pv. *vesicatoria*, agente causal da mancha do tomateiro; duas linhagens de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, agente da murcha bacteriana em mandioca; uma linhagem de *X. campestris* pv. *campestris*, agente da podridão negra em brássicas; duas linhagens de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, agente do crestamento bacteriano em feijoeiro e uma linhagem de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, agente da murcha bacteriana do feijoeiro.

A linhagem TC3.4.2R3 apresentou espectro mais restrito e menores halos de inibição com relação a linhagem TH2.2.3R3, sendo capaz de inibir os patógenos *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Enquanto que a linhagem TH2.2.3R3 somente não foi capaz de inibir a linhagem *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 110905.8 demonstrando que o antagonismo nesse caso foi cepa-específica, sendo o mesmo observado para a linhagem TC3.4.2R3 com relação a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Tabela 7).

Tabela 7 - Ensaio de antagonismo para as linhagens *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 e *B. cepacia* TH2.2.3R3 frente a bactérias fitopatogênicas

Antagonismo a	Linhagem	
	TC3.4.2R3	TH2.2.3R3
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	++	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> Mam 2763F	-	+++
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> Mand 2077	-	+++
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-	++++
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> UFLA3	++	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> 110905.8	-	-
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	-	++++

-, sem inibição; +, zona de inibição 2-10 mm; ++, zona de inibição 11-20 mm; +++, zona de inibição 21-30 mm; e +++++, zona de inibição 31-50mm.

Os ensaios de antagonismo destas duas linhagens de *Burkholderia*, frente a bactérias fitopatogênicas de elevada importância em algumas culturas, evidenciou mais uma vez o grande potencial das mesmas para o biocontrole.

2.3.6 Mutagênese por inserção aleatória utilizando transposon

2.3.6.1 Teste de sensibilidade a canamicina

A estratégia utilizada no presente trabalho para a identificação dos genes associados a atividade antibacteriana em *Burkholderia* foi a mutagênese por inserção aleatória de transposon. Visto que o complexo transposoma escolhido possui o gene de resistência a canamicina *nptII* (neomicina fosfotransferase II) como marca de seleção, um pré-requisito para o uso dessa metodologia é a sensibilidade da linhagem receptora a canamicina. Portanto, tendo em vista que as linhagens TC3.4.2R3 e TH2.2.3R3 apresentaram ação antibacteriana, foram testadas quanto à sensibilidade ao antibiótico canamicina e para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Foi observada resistência a canamicina pela linhagem TH2.2.3R3 em todas as concentrações testadas, impossibilitando assim sua utilização com este sistema de mutagênese. Já a linhagem TC3.4.2R3 foi sensível a $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do antibiótico canamicina, e portanto foi escolhida para os experimentos de mutagênese.

2.3.6.2 Mutagênese utilizando transposon e seleção quanto à alteração na atividade de antagonismo bacteriano

Neste trabalho foi obtida uma biblioteca de transformantes de *Burkholderia cenocepacia* TC3.4.2R3 por mutagenêse aleatória utilizando o transposon EZ-Tn5 <R6Kygori/KAN-2>Tnp sendo que aproximadamente 4×10^3 transformantes resistentes a canamicina foram obtidos. Foi realizado controle sem adição do transposon não tendo sido observada nenhuma colônia em meio suplementado com canamicina, indicando que a formação de colônias resistentes a canamicina não ocorrerá espontaneamente.

Um total de 1788 mutantes foram selecionados e estocados a -80°C em placas de 96 poços com meio líquido LB contendo 10% de glicerol esterilizado.

A biblioteca por inserção aleatória de transposon para a linhagem TC3.4.2R3 de *Burkholderia cenocepacia* foi parcialmente caracterizada totalizando 960 transformantes analisados. Para o ensaio de atividade antibacteriana foi utilizado o Método da sobrecamada o qual se mostrou bastante eficiente permitindo a análise rápida de centenas de transformantes em um curto espaço de tempo.

Na primeira etapa de seleção (*screening*) o ensaio de antagonismo frente a *X. albilineans* revelou 215 mutantes hipotéticos que perderam a atividade antibacteriana. Em uma segunda etapa foram selecionados 20 mutantes que foram novamente avaliados em triplicata para a confirmação do fenótipo observado inicialmente. Após as análises foram selecionados doze mutantes que apresentaram estabilidade no fenótipo inicial e posteriormente os mesmos foram avaliados quanto a capacidade antagonista frente as bactérias indicadoras *X. albilineans*, *C. flaccumfaciens* EF 1/6, *E. coli* ATCC 25992, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA3, que foram previamente inibidas pela cepa selvagem. Esta análise confirmou que os doze mutantes perderam a atividade inibitória frente a todas as bactérias testadas (Figura 7), evidenciando que vias essenciais comuns do metabolismo secundário foram afetadas nestes mutantes. Contudo, convém ressaltar que a ausência de atividade antibacteriana medida por testes de difusão em ágar não demonstra necessariamente a incapacidade da linhagem em produzir compostos bioativos tornando necessária uma melhor caracterização desses mutantes através de futuras análises bioquímicas.

2.3.6.3 Confirmação da transformação por PCR e análise de *Southern Blot*

Os mutantes que apresentaram resposta modificada ao antagonismo bacteriano foram inicialmente analisados por PCR utilizando os primers Tn5F e Tn5R. A transformação foi confirmada pela amplificação de um fragmento de 569pb

correspondente a uma região do transposon a partir do DNA genômico dos doze mutantes e, não a partir do selvagem (Figura 8).

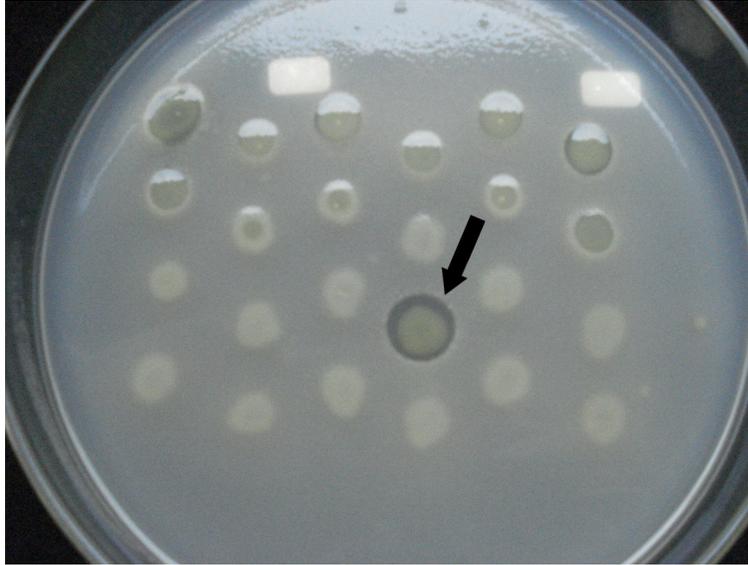


Figura 7 - Exemplo de placa de caracterização de transformantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3. É possível visualizar transformantes que perderam a capacidade antagonista frente a *X. albilineans*. A seta indica a zona de inibição da cepa selvagem

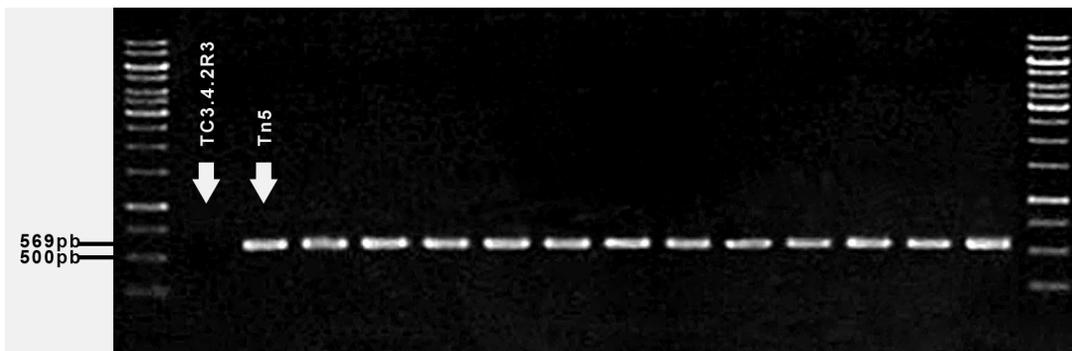


Figura 8 - Amplificação de região do transposon com os primers Tn5F e Tn5R (WANG et al., 2008) a partir do DNA extraído dos doze transformantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antibacteriana. O transposon Tn5 extraído de *E. coli* DH5 α -*pir*: Tn5 foi utilizado como controle positivo. Não houve amplificação a partir do DNA genômico da linhagem selvagem TC3.4.2R3. O marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil) está posicionado na lateral esquerda e direita do gel de agarose. A ordem dos transformantes, da esquerda para a direita é: TC3.4.2R3 M1 a M12

A determinação do número de cópias do transposon foi avaliada por *Southern Blot* utilizando um fragmento de 569pb do transposon como sonda para os doze mutantes. Após a análise, onze mutantes apresentaram somente uma banda de

hibridização indicando que a inserção do transposon foi única, e apenas um mutante apresentou duas bandas de hibridização revelando que ocorreram duas inserções no genoma. Nenhum sinal de hibridização foi observado para a linhagem selvagem TC3.4.2R3. A diferença nos tamanhos das bandas de hibridização indica que a inserção do transposon ocorreu em regiões distintas do genoma da linhagem TC3.4.2R3 (Figuras 9 e 10).

A elevada frequência de transformantes de *Burkholderia cenocepacia* apresentando cópia única do transposon integrada de forma aleatória é consistente com os resultados obtidos para outras espécies bacterianas que têm sido transformadas por mutagênese aleatória utilizando o complexo transposoma EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2>Tnp (GUILHABERT et al., 2001; NAKATA, 2002; SUN et al., 2003; ROUWS et al., 2008;

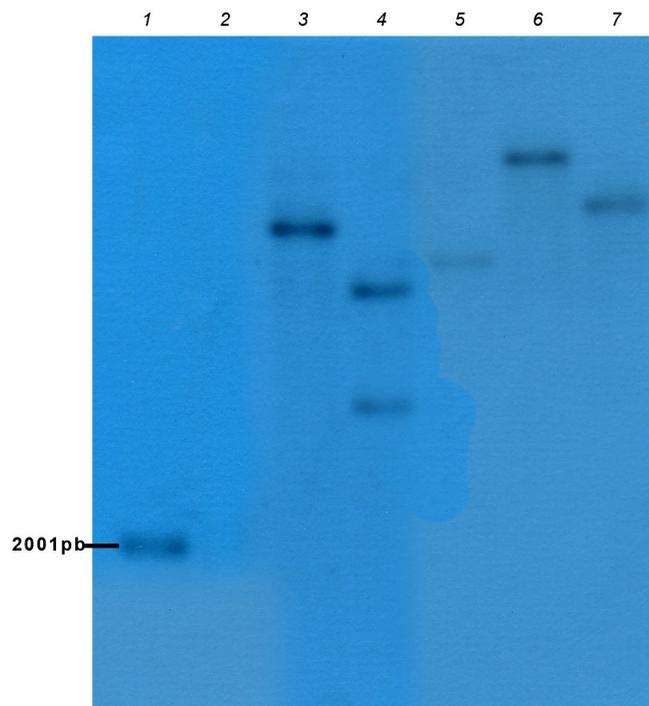


Figura 9 - Hibridização por *Southern Blot* de cinco mutantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antibacteriana. 7,5 µg de DNA genômico foram clivados com *EcoRI* transferidos para membranas de nylon e sondados com um fragmento de 560 bp de uma região do transposon. A presença de bandas de tamanhos diferentes mostra integração aleatória, e uma banda confirma a inserção única. *EcoRI* não possui sítio de restrição dentro do transposon utilizado; portanto, todos os fragmentos sondados apresentaram tamanho superior a 2001 bp. (1) EZ-Tn5 <R6Kγori/KAN-2> (2) linhagem selvagem de *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 (3-6) Transformantes M1 a M5, respectivamente

WANG et al., 2009). A inserção única evidencia que ocorreu o nocaute de apenas um gene, e que por isso, as consequências do evento podem ser relacionadas diretamente, a esta sequência. Dessa forma, a mutagênese aleatória mediada por transposon utilizada no presente trabalho mostrou-se bastante eficiente e promissora para a obtenção de mutantes na espécie *Burkholderia cenocepacia* visando não somente a identificação de genes associados a produção de metabólitos antibacterianos, mas também a outros processos, como por exemplo, genes associados a interação bactéria-planta.

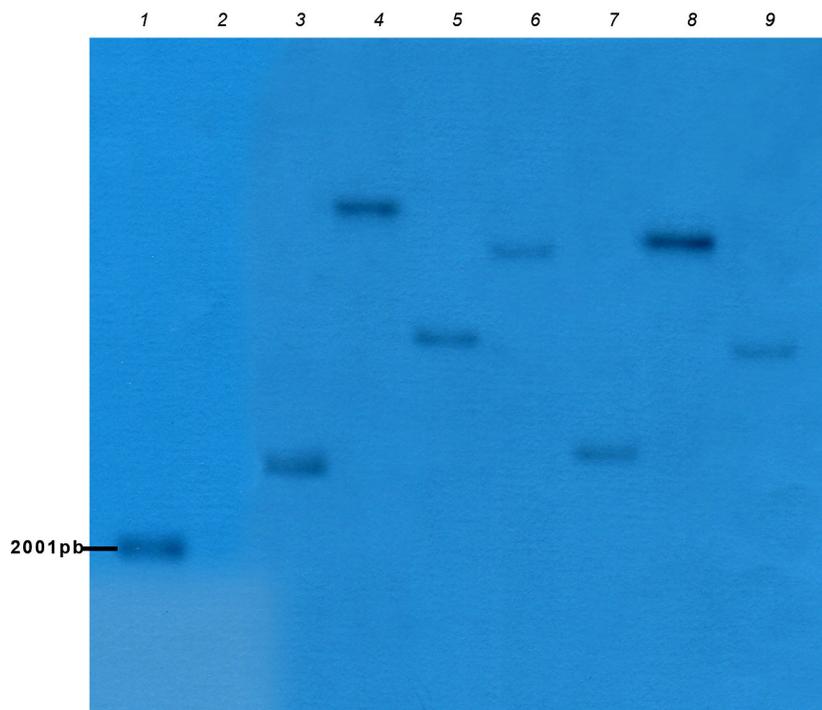


Figura 10 - Hibridização por *Southern Blot* de sete mutantes da linhagem *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 que apresentaram alteração na atividade antibacteriana. 7,5 µg de DNA genômico foram clivados com *EcoRI* transferidos para membranas de nylon e sondados com um fragmento de 560 bp de uma região do transposon. A presença de bandas de tamanhos diferentes mostra integração aleatória, e uma banda confirma a inserção única. *EcoRI* não possui sítio de restrição dentro do transposon utilizado; portanto, todos os fragmentos sondados apresentaram tamanho superior a 2001 bp. (1) EZ-Tn5 <R6Kγgori/KAN-2> (2) linhagem selvagem de *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 (3-9) Transformantes M6 a M12, respectivamente

2.3.6.4 Clonagem, sequenciamento e análise das regiões flanqueadoras do transposon

Até o presente momento estão disponíveis em banco de dados, incluindo o Integrated Microbial Genomes (IMG) system (MARKOWITZ et al., 2001), Pathema (<http://pathema.jcvi.org>), National Center for Biotechnology Information (NCBI) Microbial Genomes (WHEELER et al., 2007) e *Burkholderia* Genome Database (WINSOR et al., 2008), os genomas completos de dez linhagens de *Burkholderia* pertencentes ao complexo cepacia estando outros em andamento. Entre estes programas, estão incluídas duas linhagens de *B. ambifaria* (MC40-6 e AMMD), cepas de biocontrole associada a plantas; uma linhagem de *B. vietnamensis* G4, isolado ambiental que degrada hidrocarbonos aromáticos; *B. contaminans* cepa 383, isolado do solo; *B. multivorans* ATCC 17616; *B. lata* 383 e quatro linhagens de *B. cenocepacia* MC0-3 e AU1054 isoladas de solo; e J2315 e HI2424 isoladas de pacientes com fibrose cística. HOLDEN et al., 2009 realizaram a análise comparativa da linhagem de *B. cenocepacia* J2315, uma cepa com resistência a multidrogas e raramente isolada do meio ambiente, com outros cinco genomas completos de linhagens do complexo cepacia. Esta linhagem apresenta três replicons e um plasmídeo e a análise revelou que 9,3% do DNA cromossomal é oriundo de transferência horizontal recente e circundada por elementos genéticos móveis, e que aproximadamente 21% do genoma é único em comparação as outras linhagens evidenciando a já descrita plasticidade genômica nestas espécies. Também foram identificadas quatorze ilhas genômicas que estão ausentes em outras linhagens de *Burkholderia* spp., o que explica a introdução de funções que promovem a sobrevivência e patogenicidade em pacientes com fibrose cística.

Com o objetivo de identificar os genes interrompidos pelo transposon nos doze transformantes da linhagem TC3.4.2R3 de *B. cenocepacia* que apresentaram atividade antibacteriana alterada, as regiões genômicas das linhagens mutantes contendo o transposon foram clonadas em *E. coli* DH5 α -*pir* que teve o DNA plasmidial extraído e enviado para sequenciamento (Figura 11). Foram avaliadas 96 sequências, obtidas dos

12 mutantes de *B. cenocepacia*, ou seja 8 sequências para cada clone. Os resultados mostram que a identidade do gene truncado foi a mesma quando comparada as oito sequências dos clones (plasmídio de *E. coli* DH5 α -*pir*) proveniente do mesmo mutante, mas foi diferente entre dez mutantes (*B. cenocepacia*), sendo que dois apresentaram a interrupção do mesmo gene. Este resultado mostra que diferentes genes foram inativados pela mutagênese aleatória, resultando em perda da capacidade de produzir compostos antibacterianos.

A análise das sequências flanqueadoras do transposon dos doze mutantes da linhagem TC3.4.2R3 de *B. cenocepacia* está sumarizada na Tabela 8. As sequências obtidas apresentaram elevada similaridade com as sequências de proteínas depositadas no GenBank, sendo possível a comparação das sequências com os dados gerados em programas de sequenciamento do genoma de diferentes linhagens de *Burkholderia* spp. O resultado da análise dos mutantes TC3.4.2R3 M1 a M12 permitiu a identificação de genes associados a produção de bacteriocinas, a enzimas possivelmente associadas ao metabolismo secundário, a regulação da expressão



Figura 11 - DNA plasmidial contendo o transposon EZ-Tn5 <R6K γ gori/KAN-2>KAN-2 extraído de células de *E. coli* DH5 α -*pir* (QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN) e enviados para sequenciamento a jusante e a montante utilizando os primers FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e R6KAN-2 RP-1 (5'-CTACCCTGTGGAACACCTACATCT-3') que anelam nas extremidades do transposon. (A-G: Clones dos mutantes TC3.4.2R3 M1 a M7, respectivamente). O marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas Life Sciences, Brasil) está posicionado na lateral esquerda do gel de agarose

gênica, a transportadores celulares, ao metabolismo primário da célula e a proteínas hipotéticas com função desconhecida.

A sequência de DNA identificada no mutante TC3.4.2R3 M1 apresentou alta similaridade com uma proteína de montagem da placa basal de fagos de *B. cenocepacia* J2315 (E value= $2e^{-58}$; identidade=96%), de outras linhagens e espécies bacterianas cujo genoma tem sido completamente sequenciado e submetidos a anotação genômica. Também apresentou similaridade a uma bacteriocina de *Pseudomonas putida* KT2440 denominada piocina R2_PP (E value= $3e^{-14}$; identidade=38%) que é semelhante a cauda de fagos.

Genomas virais integrados ou profagos são uma classe de elementos genéticos móveis (EGM), adquiridos por transmissão horizontal, que podem constituir de 10 a 20% dos genomas bacterianos representando um dos principais fatores responsáveis por introduzir novos genes e promover diferenças individuais entre espécies. O conhecimento atual sobre o impacto de EGM em genomas hospedeiros vem primeiramente das ilhas de patogenicidade em que bacteriófagos, plasmídeos e transposons podem carregar genes codificadores de toxinas, proteínas efetoras, enzimas modificadoras da parede celular, fatores de adaptabilidade e determinantes de resistência a metais pesados e antibióticos, mas pouco se sabe sobre a diversidade de funções desses EGMs em não patógenos, onde esses elementos podem estar associados a adaptação da bactéria hospedeira a alterações ambientais ou colonização de novos nichos (MAVRODI et al., 2009). Muitos desses profagos são defectivos, mas muitos permanecem funcionais como agentes de transferência gênica e bacteriocinas (CASJENS, 2003; MAVRODI et al., 2009).

As bacteriocinas são tradicionalmente definidas como compostos de natureza protéica produzidas por bactérias e que são capazes de inibir a multiplicação de outras bactérias taxonomicamente afins (RILEY, 2002). Entretanto, um grupo especial de bacteriocinas, é caracterizado por partículas de alto peso molecular, as quais podem ser sedimentadas por ultracentrifugação e resolvidas por microscopia eletrônica como semelhantes a cauda de fagos (REEVES, 1965), mas em contraste com os profagos

Tabela 8 - Análise das seqüências flaqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia cenocepacia* TC3.4.2R3, endofítica de cana-de-açúcar, que apresentaram alteração na atividade antibacteriana

		Blastn		Blastx		Domínios conservados e ORFs	
Mutante	Southern blot	(acesso, identidade e E value)	(acesso, identidade e E value)	(acesso, identidade e E value)	(acesso, identidade e E value)		
M1	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 cromossomo 1 (AM747720; 92%; 3e ⁻¹⁵⁴)	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 de fagos (YP_002229267.1; 96%; 2e ⁻⁵⁸)	Proteína de montagem da placa basal de fagos (YP_002229267.1; 96%; 2e ⁻⁵⁸)	cl11432: Superfamília Phage_base_V: proteínas de fagos responsáveis pela montagem da placa basal e responsáveis pela formação da cauda.		
		<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (NC_002947; 38%; 2e ⁻¹²)	Piocina R2_PP (NP_745195.1; 38%; 3e ⁻¹⁴)		Encontradas em bactérias por transmissão horizontal. TIGR01644: Phage_P2_V: proteínas e bacteriocinas relacionadas ao produto gênico da cauda do fago P2.		
M2	2	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6 cromossomo 1 (CP001025.1; 86%; 3e ⁻⁸⁰)	Glicosiltransferase grupo 1 (YP_001807481; 88%; 6e ⁻²⁷)		cl10013: Superfamília de glicosiltransferase tipo GTB.		
M3	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MCO-3 (CP000958.1; 88%; 6e ⁻¹⁰¹)	Lipase GDSL (YP_001763613.1; 86%; 4e ⁻³²)		cl01053: Superfamília hidrolases GDSL ou SGNH: família diversa de lipases e estearases.		
M4	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 cromossomo 2 (AM747721.1; 89%; 1e ⁻¹²⁴)	Proteína regulatória da família TetR (YP_002234668.1; 92%; 0,011)		cl08268: Família de proteínas regulatórias TetR pfam00440.		
M5	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 cromossomo 1 (AM747720; 84%; 3e ⁻⁹⁴)	Proteína hipotética BCAL1885 (YP_002231012; 90%; 9e ⁻²³)				
		<i>Burkholderia cenocepacia</i> MCO-3 cromossomo 1 (CP000958.1; 87%; 2e ⁻⁷⁷)	Regulador transcricional da família XRE (YP_001765120; 90%; 9e ⁻²³)		cl09100: Superfamília de proteínas semelhantes a família XRE, envolvida com resposta a xenobióticos.		
M6	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MCO-3 cromossomo 1 (CP000958.1; 97%; 0,0)	Glutamato sintase (YP_001763683.1; 95%; 5e ⁻⁶³)		cl00319: Superfamília Glutamina amidotransferase classe II (GATase).		

(continua)

Tabela 8 - Análise das seqüências flaqueadoras do transposon de mutantes de *Burkholderia cenocepacia* TC3.4.2R3, endofítica de cana-de-açúcar, que apresentaram alteração na atividade antibacteriana

		(conclusão)		
Mutante TC3.4.2R3	Southern blot	Blastn (acesso, identidade e E value)	Blastx (acesso, identidade e E value)	Domínios conservados e ORFs
M7	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 cromossomo 2 (AM747721.1; 95%; 1e ⁻⁸⁴)	Bomba de efluxo hipotética (YP_002233974.1; 94%; 4e ⁻²⁹)	cl10482: Superfamília KefB: sistemas de transporte, componentes de membrana. pfam02254: Domínio TrKA-N de ligação ao NAD. Proteína hipotética PE36_24166 identidade 100% <i>Moritella</i> sp. PE36. cd03354: Superfamília LbetaH serina acetiltransferase (SAT).
M8	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 cromossomo 1 (AM747720.1; 92%, 0,0)	Serina O-acetiltransferase (YP_002231283.1; 96%; 2e ⁻⁶¹)	
M9	1	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (CP000124.1; 59%; 7e ⁻³¹) <i>Burkholderia cenocepacia</i> MCO-3 cromossomo 1 (CP000958.1; 98%; 0,0)	Proteína hipotética BURPS1710b_2687TIGR01172: Multidomínio serina acetiltransferase. Proteína hipotética conservada Bcenmc03_1000 (YP_001764299.1; 97%; 9e ⁻⁷¹)	
M10	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 cromossomo 1 (CP000458.1; 91%; 9e ⁻¹³⁵)	Proteína de transportador de cromato hipotética (YP_836185.1; 91%; 8e ⁻⁵¹)	cl00902: Superfamília de transportadores de cromato.
M11	1	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC17616 (99%; 0,0)	Proteína hipotética BMULJ_05097 (YP_001949472; 79%; 3e ⁻²⁴)	-
M12	1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MCO-3 cromossomo 1 (CP000958.1; 97%; 0,0)	Glutamato sintase (YP_001763683.1; 95%; 2e ⁻⁷⁴)	cl00319: Superfamília Glutamina amidotransferase classe II (GATase).

não defectivos essas bacteriocinas não são capazes de se multiplicar na bactéria alvo (DAMASKO et al., 2005). Bacteriocinas semelhantes a fagos tem sido caracterizadas em bactérias Gram negativas (JACOB et al., 1954; GROSS, VIDAVER, 1978; NGUYEN et al., 1999; MICHEL-BRIAND, BAYSSE, 2002; JABRANE et al., 2002; DAMASKO et al., 2005), e mais recentemente em Gram positivas (KAMOUN et al., 2009).

A ação antibacteriana por meio da ação citotóxica de fibras semelhantes a cauda de fagos tem sido observada principalmente em bactérias Gram negativas fitopatogênicas, sendo que as mais estudadas são as carotovoricinas produzidas por *Pectobacterium carotovora* (YAMADA et al., 2006); além das bacteriocinas produzidas por *Ralstonia solanacearum* (Sin.: *Pseudomonas solanacearum*) (CHEN, ECHANDI, 1984); *Serratia plymthicum* e *Erwinia amylovora* (JABRANE et al., 2002) entre outras (HOLTSMARK, EIJSNK, BRURBERG, 2008).

A análise da sequência com a ferramenta ORF Finder revelou um domínio conservado da superfamília Phage_base_V que é formada por proteínas de fagos responsáveis pela montagem da placa basal e da cauda. Membros desta superfamília inclui a família Fago P2_V composta por proteínas de fagos e bacteriocinas relacionadas ao fago P2 de *Escherichia coli*, sendo que as mesmas estão associadas a síntese da cauda de fagos (HAGGARD-LJUNGQUIST et al., 1995).

As mais bem estudadas bacteriocinas semelhantes a cauda de fagos são as produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* e são denominadas piocinas R e F, sendo que esta relação entre bacteriocinas e fagos tem sido considerada desde 1952 por Jacob et al. (MICHEL-BRIAND, BAYSSE, 2002) quando descreveram a primeira piocina insensível a ação de proteases, estável a 70°C e susceptível de ser concentrada através de precipitação com sulfato de amônia em uma concentração de 66%, características atualmente conferidas as piocinas do tipo R, que são semelhantes a cauda de bacteriófagos não flexíveis mas contráteis (Figura 12).

As piocinas R e F são derivadas de um gene ancestral, com similaridade ao fago P2 e lambda λ , respectivamente. No entanto, não há nenhum gene para a formação do capsídeo, nem para a replicação e integração, significando que as piocinas dos tipos R

e F são vistas como caudas de fagos que se tornaram evolutivamente especializadas como bacteriocinas, ao invés de simples fagos defeituosos (WILLIAMS et al., 2008). O mesmo foi observado na análise do contexto genômico da linhagem J2315 de *B. cenocepacia* sendo que próximo ao gene que apresentou similaridade com o gene interrompido pelo transposon em *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 não foram identificados genes envolvidos com a morfogênese do capsídeo, indicando que o profago identificado não apresenta genes para codificar um vírus funcional, mas pode atuar como uma bacteriocina.

A provável bacteriocina identificada na linhagem TC3.4.2R3 de *B. cenocepacia* pode ser considerada semelhante as piocinas do tipo R do gênero *Pseudomonas* pois além de compartilhar similaridade de sequência, também revelou-se estável a proteases, ao aquecimento e susceptível a precipitação com sulfato de amônia. De acordo com a norma convencional para a nomenclatura de bacteriocinas, a bacteriocina produzida por *B. cenocepacia* foi denominada cenocepacina, sendo este o primeiro relato em uma linhagem endofítica pertencente ao complexo cepacia.

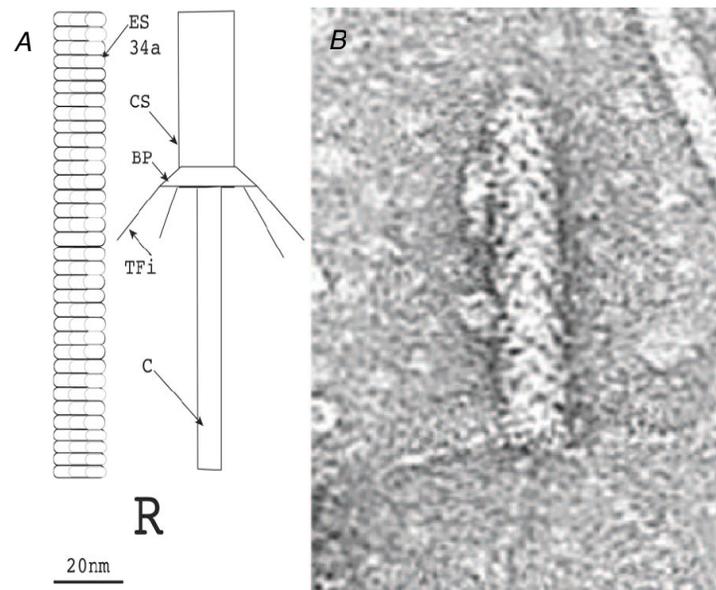


Figura 12 - Representação esquemática (A) e imagem de microscopia eletrônica (B) da estrutura da piocina R2 de *Pseudomonas aeruginosa*. O aspecto nativo apresenta-se como uma bainha estendida (ES) composta por 34 anéis, sendo cada um deles composto por 6 subunidades. A bainha contraída (CS), termina na base da placa (BP) com as fibras da cauda (TFi), revela o core (C). Fonte: MICHEL-BRIAND, BAYSSE (2002); WILLIAMS et al. (2008)

A análise do contexto genômico da linhagem J2315 de *B. cenocepacia* que apresentou similaridade com o gene interrompido pelo transposon em *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 também revelou a presença de diversos genes hipotéticos associados a estrutura do profago, ao seu mecanismo de ação e regulação da produção. Dentre os genes envolvidos com a estrutura da bacteriocina está uma proteína principal da bainha da cauda do fago associada a rápida contratilidade e penetração do *core* através da membrana externa, processo necessário para a atividade bactericida (SHINOMIYA, OSUMI, KAGEYAMA, 1975); além de proteínas da fibra da cauda e proteína de ligação ao peptideoglicano, constituinte das paredes celulares bacterianas. Já os genes associados ao mecanismo de ação foram pesquisados com base no que é descrito para as piocinas e outras bacteriocinas semelhantes a cauda de fagos. Essas bacteriocinas apresentam modo de ação bactericida por provocar a despolarização da membrana plasmática com a formação de poros. A atividade lítica é fornecida pela ação combinada de uma pequena proteína de membrana (holina) e uma mureína citoplasmática (endolisina). A holina permeabiliza a membrana citoplasmática formando poros e permite o acesso da endolisina ao peptideoglicano (MAVRODI et al., 2009). Dentro desse contexto foi identificado um gene hipotético de uma mureína lítica de ligação a membrana externa próximo a região de inserção do transposon.

Também foram identificadas seis cópias do gene *recA* responsável pela expressão da proteína RecA que tem sido descrita como responsável pela clivagem de proteínas repressoras de fagos, liberando a expressão de proteínas ativadoras da síntese de piocinas tipo R e F (MICHEL-BRIAND, BAYSSE, 2002).

Em um estudo realizado por Kamoun et al. (2009) utilizando mutagênese aleatória por mini - transposon Tn10, foram avaliados genes associados a produção de bacteriocina F4, uma bacteriocina produzida por *Bacillus thuringiensis* já caracterizada bioquimicamente. A análise de um mutante defeituoso para a produção de bacteriocina também revelou alta similaridade com um componente da cauda de fagos. Os autores propuseram que essa cauda de fago pode ser a própria bacteriocina ou necessária para o transporte da bacteriocina propriamente dita. Esse conceito pode ser sustentado pelo encontrado em *Serratia entomophila* e *S. proteomacculans* que produzem estruturas

semelhantes a caudas de fagos sem nenhuma atividade de bacteriocina mas necessária para o transporte de toxinas no interior do intestino da larva *Costelytra zelandika* (HURST et al., 2007). Portanto, mais estudos são necessários para determinar outros genes envolvidos na síntese, translocação, regulação e mecanismos de imunidade dessa provável bacteriocina semelhante a cauda de fago em *B. cenocepacia* TC3.4.2R3.

A análise dos mutantes TC3.4.2R3 M2, M3, M6, M8 e M12 revelou similaridade com enzimas provavelmente envolvidas direta ou indiretamente com o metabolismo secundário da célula. Utilizando a ferramenta BlastX, foi observado que a sequência obtida do mutante TC3.4.2R3 M2 apresentou maior similaridade com uma glicosiltransferase grupo 1 (E value= $6e^{-27}$; identidade=88%) de *Burkholderia ambifaria* MC40-6, além de outras espécies dentro do gênero *Burkholderia*. As glicosiltransferases (GTs) representam uma das enzimas mais abundantes em sistemas biológicos sendo responsáveis por catalisar a síntese de glicoconjugados, incluindo glicolipídeos, glicoproteínas e polissacarídeos pela transferência de resíduos de mono ou oligossacarídeos ativados para uma molécula aceptora para o início ou alongação de uma cadeia de carboidrato (KAPITONOV, YU, 1999).

Todas as categorias de biopolímeros além de numerosos produtos naturais bioativos são modificados por glicosiltransferases, com efeitos notavelmente variados. Até o momento, são mais de 15.800 GTs depositadas em bancos de dados de proteínas classificadas em 91 famílias de acordo com a similaridade de sequência de aminoácidos. A maioria das glicosiltransferases pertencem a somente duas superfamílias estruturais denominadas GT-A e GT-B, cada uma consistindo de dois domínios. As GTs bacterianas envolvidas na glicosilação de metabólitos secundários pertencem a família GT1 que catalisam a glicosilação de pequenas moléculas lipofílicas estabelecendo ligações glicosídicas com oxigênio, carbono, nitrogênio e enxofre. ERB et al. (2009) investigaram a função de várias GTs através de experimentos de expressão e inativação gênica focando as GTs associadas à síntese de policetídeos aromáticos e macrolídeos em actinobactérias do gênero *Streptomyces*, visto que muitos estudos descrevem esse envolvimento (FERNANDEZ et al., 1998).

O conhecimento e a caracterização estrutural e funcional de glicosiltransferases envolvidas com a síntese de metabólitos secundários em outros grupos taxonômicos bacterianos é bastante escasso. Recentemente, foi descrito em *Burkholderia contaminans* através da análise de mutantes, um gene de glicosiltransferase associado a atividade antifúngica de um oligopeptídeo ativo contra *Geotrichum candidum* (GU et al., 2009). Apesar da grande relação das glicosiltransferases com a modificação de metabólitos secundários, no mutante TC3.4.2R3 M2 a análise de *Southern Blot* revelou duas cópias do transposon, dessa forma não podemos afirmar que o fenótipo observado está relacionado a uma mutação nesse gene. Faz-se necessária a complementação da linhagem selvagem com a sequência do gene identificado, ou análise por meio de interrupção gênica da linhagem selvagem, para confirmação do envolvimento deste gene na atividade antibacteriana.

Mas por outro lado, a identificação desse gene abre novas perspectivas para uma análise estrutural e funcional mais profunda, visto que as glicosiltransferases têm sido estudadas como valiosas ferramentas para o desenvolvimento de novos metabólitos glicosilados. Contudo convém ressaltar que o uso de glicosiltransferases como ferramentas biotecnológicas ainda é um desafio, pois apesar de muitas GTs terem sido caracterizadas bioquimicamente, falta conhecimento sobre a função exata e principalmente a relação entre estrutura e função.

A análise da sequência do mutante TC3.4.2R3 M3 apresentou maior similaridade com uma lipase GDSL (E value= $4e^{-32}$; identidade=86%) de *Burkholderia cenocepacia* MC0-3 (E value= $6e^{-101}$; identidade=88%;) a qual pertence a Superfamília de hidrolases GDSL ou SGNH que inclui diversas famílias de esterases e lipases. As lipases e esterases são um importante grupo de enzimas associadas ao metabolismo e a hidrólise de lipídeos, podendo ser encontradas em animais, vegetais e também em micro-organismos. Nas bactérias a maioria das lipases são extracelulares sendo as principais espécies produtoras pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (GUPTA, GUPTA, RATHI, 2004), fato também demonstrado por Luvizotto (2008) que ao avaliar a atividade esterásica e lipolítica das linhagens de *Burkholderia*

spp. endofíticas e rizoféricas utilizadas neste estudo observou que todas apresentaram essa capacidade incluindo a linhagem TC3.4.2R3.

A superfamília de hidrolases GDSE possui pouca similaridade com as lipases verdadeiras e inclui lipases e esterases hidrolíticas com propriedades multifuncionais além de ampla especificidade de substratos. Esta subclasse de enzimas lipolíticas possui uma sequência motivo GDSE diferente dos motivos encontrados em outras lipases e possuem sítio ativo flexível que parece alterar sua conformação em função de diferentes substratos. Algumas das enzimas GDSE tem atividade tioesterase, protease, arilesterase e lisofosfolipase (AKOH et al., 2004).

Enzimas lipolíticas possuem um alto potencial biotecnológico e industrial para uso na hidrólise e síntese de importantes compostos ésteres sendo que as principais aplicações envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produção de produtos farmacêuticos, agroquímicos, pesticidas e inseticidas (GUPTA, GUPTA, RATHI, 2004). Lipases produzidas por espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* são mais comumente utilizadas em detergentes e processos de transesterificação em indústrias químicas, devido as suas características de resistência a temperatura e a solventes (AKOH et al., 2004).

A maioria das lipases GDSE não possuem ainda função bioquímica (relação estrutura-função) ou aplicação conhecidas, por apresentarem estruturas muito diversificadas. Contudo em alguns micro-organismos sua função fisiológica tem sido estudada. Na bactéria, *Serratia liquefaciens* MG1, associada às raízes de tomateiro, o sistema *quorum sensing* (QS) está envolvido na produção de enzimas extracelulares e motilidade. Próximo ao cluster gênico regulado por QS foi identificado o gene *estA*, que codifica uma esterase GDSE. Este gene foi expresso de forma heteróloga em *E. coli* demonstrando que *estA* não é regulado por QS. Entretanto foi constatado que o mutante *estA* produz quantidades bem reduzidas de acil homoserina lactonas (AHL) comparada com a selvagem em meio contendo Tween 20 e 80 como fonte de carbono. Sugerindo que em certas condições de crescimento a EstA pode ser importante para fornecer às células, precursores necessários para a biossíntese de AHLs visto que tioesterases liberam aminoácidos livres do complexo acil-ACP como último passo da

biossíntese de ácidos graxos (RIEDEL et al., 2003). As enzimas tioesterases também compõem um dos domínios PKS envolvidos na síntese de antibióticos policetídeos sendo o domínio tioesterase o responsável pela liberação do produto (WATANABE, PRASEUTH, WANG, 2007).

Como o grupo das lipases e principalmente da Superfamília GDSL é altamente diversificado entre as bactérias, futuras investigações são necessárias para a identificação da função fisiológica dessa provável lipase GDSL na linhagem TC3.4.2R3 e seu envolvimento com a perda da atividade antibacteriana nesse mutante.

A análise de DNA para os mutantes TC3.4.2R3 M6 e M12 revelou a interrupção do mesmo gene, mas em regiões genômicas distintas conforme observado pela análise de *Southern Blot*. O gene mutado apresentou similaridade com uma glutamato sintase dependente de ferredoxina (E value=5e⁻⁶³; identidade=95%) a qual pertence a superfamília Glutamina amidotransferase classe II (GATase), sendo que o domínio glutaminase catalisa a transferência do nitrogênio da glutamina para o substrato apropriado e nesse processo a glutamina é hidrolisada a glutamato e amônia. A enzima glutamato sintase está envolvida em diversos processos como o metabolismo do glutamato, aspartato e alanina; o metabolismo do nitrogênio principalmente em bactérias fixadoras de nitrogênio, entre outras rotas metabólicas (MENARD et al., 2007). A caracterização fisiológica de mutantes para a enzima glutamato sintase em *Pseudomonas putida* KT2440, bactéria colonizadora da raiz, revelou células imóveis, incapazes de utilizar aminoácidos ácidos, como o glutamato e aspartato e suas amidas como fonte de carbono e incapazes de crescer em condições com restrição das fontes de nitrogênio (SONAWANE, ROHM, 2004).

A glutamato sintase forma com a glutamina sintetase a rota principal de assimilação de amônia em micro-organismos e plantas por catalisar a transferência do grupo amida da L-glutamina para o carbono do 2-oxoglutarato originando duas moléculas de L-glutamato. Em bactérias o glutamato não é somente precursor de outros aminoácidos, mas também está envolvido na osmorregulação (NANDINENI et al., 2004) e em alguns casos como precursor da biossíntese de ferro, como substrato de

proteínas carreadoras de acila (ACP) (VANONI, CURTI, 1999) e como fonte de grupos amino para a produção de antibióticos e antitumorais (BORODINA et al., 2005).

As proteínas carreadoras de acila (ACP) são altamente conservadas e possuem papel central na síntese e transferência de grupamentos acila para a síntese de uma variedade de produtos lipídicos. Além da biossíntese de ácidos graxos, as ACP bacterianas também fornecem grupamentos acila para a síntese de fosfolípidos, lipídio A, hemolisinas e acil homoserina lactonas envolvidas no mecanismo *quorum sensing* (GONG, BYERS, 2003).

As ACPs são proteínas discretas que interagem com sistemas multienzimáticos de sintases ácidos graxos ou sintases policetídeos envolvidos, por exemplo, na síntese de antibióticos policetídeos (WATANABE, PRASEUTH, WANG, 2007). Os policetídeos são cadeias de ácidos graxos provenientes do metabolismo secundário produzidos por vários organismos, incluindo plantas, fungos e bactérias e que podem apresentar atividades farmacológicas como antitumorais, imunossupressores, fitoalexinas e antibióticos. Esses compostos são organizados em módulos funcionais e sintetizados por via não-ribossomal pela ação de enzimas denominadas policetídeos sintetases (PKS). O processo de síntese de antibióticos policetídeos ocorre pela ação de uma aciltransferase (AT) responsável pela ativação de ácidos graxos, de uma proteína carreadora acila (ACP) que transporta os substratos participando da elongação e de um domínio cetosintase (KS) que catalisa a reação de elongação (MINOWA, ARAKI, KANEHISA, 2007).

Em diversas espécies de actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* tem sido demonstrada conexão entre o metabolismo primário e o secundário com relação a síntese de antibióticos. Como exemplo, em *S. coelicolor*, bactéria modelo dentro desse gênero quanto a produção de antibióticos, foi demonstrada uma alta correlação entre genes do metabolismo primário como a biossíntese de glutamato, cisteína, arginina, glutamina, homoserina, sulfato entre outros, e a produção de antibiótico (ALAM et al., 2010).

Diante da perda da atividade antibacteriana nesses mutantes podemos hipotetizar que a interrupção do gene da enzima glutamato sintetase afetou vias metabólicas centrais que indiretamente podem ter afetado mecanismos envolvidos com a síntese de policetídeos antibióticos ou até mesmo com a síntese de moléculas *quorum sensing*, já descritas como indutoras da expressão de genes associados a produção de antibióticos (WEI, ZHANG, 2006) e bacteriocinas (STRAUME et al., 2007; VIAL et al., 2007).

A análise do mutante TC3.4.2R3 M8 revelou alta similaridade com uma serina acetiltransferase (E value= $2e^{-81}$; identidade=96%) de *Burkholderia cenocepacia* J2315 e média similaridade com uma proteína hipotética BURPS1710b_2687 de *Burkholderia pseudomallei* (E value= $7e^{-31}$; identidade=59%).

A enzima serina acetiltransferase catalisa a acetilação dependente de acetil-coenzima A de L-serina a O-acetilserina, como passo inicial da rota biossintética que leva a formação de cisteína, sendo esta reação a etapa metabólica principal de regulação (PYE et al., 2004). Conforme descrito anteriormente para o glutamato, o aminoácido cisteína também pode estar envolvido na biossíntese de antibióticos como por exemplo atuando como substrato de peptídeo sintases não ribossômicas (NPRS) e policetídeo sintases (PKS) já demonstrado para as policetídeo sintase do tipo III envolvidas na síntese dos antibióticos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina em espécies do gênero *Streptomyces* (TSENG et al., 2004).

A análise dos mutantes TC3.4.2R3 M4 e M5 revelou a interrupção de genes reguladores transcricionais. O mutante TC3.4.2R3 M5 apresentou similaridade com um regulador transcricional pertencente a família XRE (E value= $9e^{-23}$; identidade=90%) além de uma proteína hipotética BCAL1885 (E value= $9e^{-23}$; identidade=90%) de linhagens MC0-3 e J2315 de *B. cenocepacia*, respectivamente. Estes reguladores transcricionais da família XRE são caracterizados por apresentarem motivo de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice e tem sido descritos como proteínas repressoras principalmente de profagos, incluindo uma bacteriocina semelhante a cauda de fagos denominada phibacina em *Bacillus subtilis* (McDONNELL et al., 1994; DAS et al., 2007).

A análise do contexto genômico na linhagem de *B. cenocepacia* MC0-3 que apresentou similaridade com o gene interrompido pelo transposon em *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 revelou imediatamente acima do regulador transcricional XRE, um gene que catalisa a conversão de 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato em 4-hidroxi-3-metil-2-difosfato sintase, enzima envolvida na síntese de isoprenóides que em bactérias ocorre por uma rota independente do mevalonato (PUTRA et al., 1998). Os isoprenóides ou terpenos compõem uma classe de lipídeos, produtos do metabolismo secundário, com mais de 30.000 compostos conhecidos tanto em plantas e micro-organismos. Terpenos tem sido frequentemente isolados de fungos endofíticos originados de uma variedade de plantas hospedeiras e dentre as funções identificadas a atividade antitumoral e antimicrobiana (LANGE et al., 2000).

Já a sequência de DNA do mutante TC3.4.2R3 M4 mostrou similaridade com um regulador transcricional da família TetR (E value=0,011; identidade=92%) de *B. cenocepacia* J2315 e de outras linhagens pertencentes a essa mesma espécie. A sobrevivência bacteriana em ambientes instáveis requer adaptação ampla e rápida desencadeada por proteínas regulatórias que em resposta ao meio ambiente específico e a sinais celulares modulam a transcrição, tradução e outros eventos na expressão gênica, de forma que respostas fisiológicas sejam modificadas apropriadamente. Na maioria dos casos, a resposta adaptativa é mediada por reguladores transcricionais que são classificados em famílias com base nas similaridades de sequência, estrutura e função. Dentre os reguladores transcricionais descritos estão os membros da família TetR, particularmente abundantes em micro-organismos expostos a alterações ambientais, tais como micro-organismos do solo, patógenos de plantas e animais, bactérias extremófilas e metanogênicas (RAMOS et al., 2005).

As proteínas reguladoras TetR possuem motivo de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice, e atuam tipicamente como repressoras controlando genes cujos produtos estão envolvidos com resistência a drogas (MARTIN et al., 2009), enzimas envolvidas em rotas catabólicas (HAMLIN, BLOODWORTH, CARDONA, 2009; SANTANGELO et al., 2009), *quorum sensing* (POMPEANI et al., 2008), fatores de virulência (SUN et al., 2010), bombas de efluxo (GRISTWOOD et al., 2008) formação

de biofilme (JENG et al., 2008), biossíntese de antibióticos (CHIN-A-WOENG et al., 2005; DUONG et al., 2009; LEE et al., 2010) entre outros (RAMOS et al., 2005). Dentre as mais de 2300 sequências que apresentaram o perfil descrito para a família TetR em um levantamento realizado até o ano de 2004 por Ramos et al. (2005), ao menos 85 membros possuíam função descrita, dentre eles uma proteína TetR repressora que controla a expressão de uma bomba de efluxo de antibióticos em *Burkholderia pseudomallei*. Huang et al. (2004) identificaram e caracterizaram um gene com alta similaridade às proteínas reguladoras TetR e que está envolvido com a repressão da biossíntese de pioluterina um antibiótico policetídeo produzido por *Pseudomonas* sp. M18.

Entretanto, recentemente alguns autores têm descrito proteínas TetR como reguladores positivos da expressão gênica o que até então não era descrito para essa família. Sun et al. (2010) identificaram, no patógeno humano *Burkholderia pseudomallei*, por meio de mutantes que perderam a virulência, um regulador da família TetR responsável pelo controle positivo da expressão gênica do sistema de secreção tipo III (T3SS), principal determinante da virulência em bactérias Gram negativas.

Em *Vibrio harveyi* foi demonstrado que o principal regulador do mecanismo de *quorum sensing* LuxR, é uma proteína do tipo TetR mas que pode atuar como ativadora e repressora de um grande número de genes (POMPEANI et al., 2008). Associada à síntese de metabólitos secundários tóxicos ou com atividade antibacteriana Dupuy, Matamouros (2006) descreveram proteínas TetR relacionadas a fatores sigma alternativos da RNA polimerase, e que dirigem a transcrição de bacteriocinas em *Clostridium perfringens* e de toxinas em *Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani*.

Visto que o mutante TC3.4.2R3 M4 apresentou perda da capacidade antagonista frente as bactérias testadas, uma hipótese é que proteínas transcricionais da família TetR estejam associadas a regulação gênica positiva de genes envolvidos com a biossíntese de metabólitos secundários com atividade antibacteriana, que podem ser bacteriocinas ou peptídeos não-ribossomais visto que a análise do contexto genômico do gene que em *B. cenocepacia* J2315 apresentou similaridade com o gene interrompido pelo transposon em *B. cenocepacia* TC3.4.2R3, relevou a presença de

diversas proteínas hipotéticas, mas também de genes hipotéticos de enzimas associadas ao metabolismo secundário como por exemplo acetiltransferases envolvidas na síntese de peptídeos não-ribossomais NRPS.

Nos mutantes TC3.4.2R3 M7 e M10 o transposon interrompeu genes de proteínas associadas a transportadores. O mutante TC3.4.2R3 M10 apresentou similaridade com uma proteína transportadora de cromato hipotética (E value= $8e^{-51}$; identidade=91%) a qual possui um domínio conservado da superfamília de transportadores de cromato.

A família de proteínas transportadoras de cromato (CHR) é estruturalmente semelhante a duas famílias de transportadores: Superfamília Facilitadora Principal (MFS) e a Resistência-Nodulação-Divisão (RND) que contém membros cuja função principal é a resistência a metais pesados tóxicos como o cromo, pelo efluxo de íons dependente de energia. Entretanto alguns estudos sugerem a existência de outras funções fisiológicas (DIAZ-PEREZ et al., 2007), como por exemplo, a resistência ao estresse oxidativo (NIES et al., 1998).

Já a sequência de DNA do mutante TC3.4.2R3 M7 apresentou identidade com uma bomba de efluxo hipotética de *B. cenocepacia* J2315 (E value= $4e^{-29}$; identidade=94%) e de outras espécies do mesmo gênero, a qual contém um domínio conservado da superfamília KefB que incluem proteínas envolvidas em processos metabólicos, transporte de íons e transmembrana.

Os sistemas de efluxo em bactérias são divididos em duas famílias principais em função de características estruturais e energéticas, os transportadores primários ou ABC, os quais hidrolisam ATP como fonte de energia e os secundários que utilizam sistemas de antiporte de prótons. Os transportadores secundários são mais frequentes em bactérias, sendo classificados em quatro famílias: Superfamília Facilitadora Principal (MFS); Resistência a Multi-drogas (SMR), Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (MATE) e Resistência-Nodulação-Divisão (RND) (MARQUEZ, 2005).

Bombas de efluxo multidrogas (MRD) são elementos importantes da resistência intrínseca à antibióticos em bactérias patogênicas expostas a antibióticos conforme demonstrado na análise genômica da linhagem J2315 de *B. cenocepacia* (HOLTEN et al., 2009). Mas em contraste com os genes de resistência a antibióticos que são adquiridos via transferência horizontal, genes que codificam bombas de efluxo estão presentes no cromossomo e são altamente conservados em uma espécie, sugerindo que sua função não está restrita ao efluxo de antibióticos, mas também a outras funções importantes para o *fitness* bacteriano em ecossistemas naturais. Outro fator que corrobora com esta hipótese é que a quantidade de bombas de efluxo MRD é maior em bactérias encontradas no solo ou em associação com as plantas do que em bactérias presentes em ambientes com alta exposição a antibióticos. Dentre as funções já descritas para as bombas de efluxo (MRD) as mais relevantes são a destoxificação de metabólitos intracelulares, metais pesados e solventes; virulência em hospedeiros humanos e em plantas; homeostase da célula e trânsito de moléculas responsáveis pela sinalização intercelular (MARTINEZ et al., 2009).

O sistema de comunicação bactéria-bactéria denominado *quorum sensing* (QS), envolve a síntese de moléculas autoindutoras que respondem de acordo com a densidade populacional e posteriormente se ligam a receptores ativando a expressão de um grupo específico de genes (BASSLER, 1999). Algumas das funções controladas por QS são a motilidade, a síntese de polissacarídeos, fatores de virulência e a biossíntese de peptídeos antimicrobianos.

Algumas moléculas sinalizadoras difundem livremente pela membrana mas, algumas, devido a sua natureza hidrofóbica, não são difusíveis ultrapassando a membrana por intermédio de vesículas ou por meio de transportadores de membrana dentre eles as bombas de efluxo multidrogas (MDR) (MARTINEZ et al., 2009). Embora essa não seja a função fisiológica principal das bombas de efluxo (MDR) esse mecanismo tem sido descrito para algumas bactérias.

No patógeno humano *Burkholderia pseudomallei* foi descrita uma bomba de efluxo do tipo RND responsável pela extrusão de antibióticos (macrolídeos, aminoglicosídeos, cloranfenicol e trimetoprim), mas também de moléculas *quorum*

sensing, denominadas homoserina lactonas (AHLs). O sistema QS em *B. pseudomallei* controla a produção de fatores de virulência (sideróforos e fosfolipase C) e a formação de biofilme (CHAN et al., 2007).

Pseudomonas fluorescens 2P24, bactéria isolada de trigo, é produtora de vários compostos antifúngicos dentre eles o antibiótico policetídeo 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG). Inicialmente foi demonstrado que o mecanismo de *quorum sensing* está envolvido na produção de 2,4-DAPG (WEI, ZHANG, 2006). Posteriormente em outro estudo, dois mutantes de *P. fluorescens* 2P24 foram obtidos por mutagênese com transposon que demonstraram acúmulo intracelular de 2,4-DAPG e os genes interrompidos em ambos apresentou alta identidade com genes do sistema de efluxo RND, sendo que esse mesmo sistema RND na cepa 2P24 está envolvido com a resistência a diversos antibióticos (TIAN et al., 2010).

Analisando o contexto genômico em *B. cenocepacia* J2315 foi observado que próximo ao gene interrompido pelo transposon está uma proteína de ligação ao antibiótico penicilina, dessa forma pode ser sugerido que a bomba de efluxo mutada em *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 pode representar uma bomba de efluxo multidrogas associada a extrusão de antibióticos, mas possivelmente de outros compostos como moléculas *quorum sensing* associadas a expressão de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários bioativos ou até mesmo bacteriocinas.

A análise das sequências de DNA para os mutantes TC3.4.2R3 M9 e M11 revelaram alta similaridade com proteínas hipotéticas. O mutante TC3.4.2R3 M9 demonstrou identidade com uma proteína Bcenmc03_1000 (E value= $9e^{-71}$; identidade=97%) não caracterizada em *Burkholderia cenocepacia* MC0-3 mas que apresenta um domínio conservado em bactérias. Já o mutante TC3.4.2R3 M11 apresentou similaridade com uma proteína hipotética BMULJ_05097 de *Burkholderia multivorans* ATCC17616 (E value= $3e^{-24}$; identidade=79%), sendo que a análise através das ferramentas Blastx e ORFinder não revelou nenhum domínio conservado portanto nenhuma função ainda foi descrita. Visto que esses dois mutantes apresentaram alteração em sua atividade antibacteriana essas proteínas estão provavelmente envolvidas com processos metabólitos associados a essa propriedade antagonista.

A mutagênese aleatória por transposon utilizada no presente estudo constituiu uma abordagem eficiente na identificação de genes envolvidos no metabolismo secundário de *Burkholderia*, sendo que os resultados obtidos associados a análises bioquímicas futuras para a identificação dos compostos bioativos, auxiliarão no entendimento das funções dos genes identificados assim como o real envolvimento na síntese de metabólitos antibacterianos como as bacteriocinas, peptídeos não ribossomais (NRPS) e policetídeos (PKS) por linhagens de *Burkholderia* associadas às plantas.

Os resultados do presente trabalho poderão facilitar estudos genéticos futuros contribuindo para a determinação da função de genes hipotéticos previstos nos projetos de sequenciamento e anotação de genomas de espécies de *Burkholderia* pertencentes ao complexo *cepacia* e associadas às plantas.

A identificação e o estudo de compostos extracelulares com atividade antibacteriana são importantes não somente sob o aspecto aplicado, mas também, para uma maior compreensão da função desses metabólitos bioativos na interação bactéria-planta e na interação com outros micro-organismos associados às plantas, incluindo fitopatógenos. Portanto, um outro aspecto a ser explorado em futuros trabalhos é a atividade antibacteriana da linhagem de *B. cenocepacia* (TC3.4.2R3) e dos mutantes obtidos, frente a fitopatógenos, *in planta*.

3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- 1) Bactérias endofíticas e da rizosfera de cana-de-açúcar, pertencentes ao gênero *Burkholderia*, apresentaram grande potencial em produzir metabólitos com atividade antibacteriana *in vitro*; sendo capazes de controlar *X. albilineans* importante patógeno dessa cultura;
- 2) A precipitação fracionada com sulfato de amônia mostrou-se adequada como primeira etapa de purificação de substâncias antibacterianas de natureza protéica produzidas por *B. cenocepacia* (TC3.4.2R3) e *B. cepacia* (TH2.2.3R3);
- 3) A inibição de *X. albilineans*, *C. flaccumfaciens* EF 1/6, *E. coli* ATCC 25992, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* UFLA3 por *B. cenocepacia* TC3.4.2R3 está associada:
 - 3.1) A uma bacteriocina semelhante a cauda de fagos, e que apresenta características semelhantes às piocinas R descritas no gênero *Pseudomonas*;
 - 3.2) As enzimas (glicosiltransferase, lipase, serina acetiltransferase e glutamato sintase) envolvidas no metabolismo primário e/ou secundário indicando que essa linhagem produz outros compostos antibacterianos sintetizados por via não-ribossomal;
 - 3.3) Aos reguladores transcricionais com domínio hélice-volta-hélice pertencentes às famílias XRE e TetR possivelmente envolvidos com a ativação de genes associados a produção de bacteriocinas ou peptídeos não-ribossomais;

- 3.4) Aos transportadores hipotéticos possivelmente envolvidos com o efluxo de metabólitos bioativos ou moléculas autoindutoras *quorum sensing*; e
- 3.5) As duas proteínas hipotéticas conservadas no gênero *Burkholderia*, mas com função ainda desconhecida.

REFERÊNCIAS

- AGNOLI, K.; LOWE, C. A.; FARMER, K. L.; HUSNAIN, S. I.; THOMAS, M. S. The Ornibactin Biosynthesis and Transport Genes of *Burkholderia cenocepacia* Are Regulated by an Extracytoplasmic Function σ Factor Which Is a Part of the Fur Regulon. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n. 10, p. 3631-3644, 2006.
- AKOH, C. C.; LEE, G. -C.; LIAW, Y. -C.; HUANG, T. -H.; SHAW, J. -F. GDSL family of serine esterases/lipases, **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 534-552, 2004.
- ALAM, M. T.; MERLO, M. E.; HODGSON, D. A.; WELLINGTON, E. M. H.; TAKANO, E.; BREITLING, R. Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 202, 2010.
- ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 3, p. 229-236, 2001.
- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; ELSAS, J. D. van; VUURDE, J. W. L. van; AZEVEDO, J. L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, October, 2002.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGAR-Jr., W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, New York, v. 62, p. 45-151, 1997.
- ARWIYANTO, T.; GOTO, M.; TAKIKAWA, Y. Characterization of bacteriocins produced by *Pseudomonas solanacearum*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 59, n. 2, p. 114-122, 1993.
- AZEVEDO, J. L. **Microorganismos endofíticos**. In: Ecologia Microbiana. MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). Editora EMBRAPA, Jaguariúna: 1998, p. 117-137.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, Issue of April 15, 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>>. Acesso em: 10 jun 2007.
- BAREFOOT, S. F.; KLAENHAMMER, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1808-1815, 1983.

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, n. 1-2, p. 15-24, 1997.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by *quorum sensing*. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.

BASTOS, S. A. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia**. São Paulo: Idcone, 1987. 127p.

BELL, C. R.; DICKIE, G. A.; HARVEY, W. L. G.; CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 1, p. 46-53, 1995.

BELMONTE, U. C. F. **Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros**. 2009. 67p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. H. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

BIAGI, C. M. R.; AZEVEDO, J. L. Detecção de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 49, n. 1, p. 1-8, 1992.

BLANCH, M.; LEGAZ, M. -E.; VICENTE, C. Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. **Jornal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 366-374, 2008.

BONINI, M.; MARINGONI, A. C.; NETO, J. R. Characterization of *Xanthomonas* spp. strains by bacteriocinas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 24-29, 2007.

BORODINA, I.; SCHOLLER, C.; ELIASSON, A.; NIELSEN, J. Metabolic Network Analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* Species with an Active Entner-Doudoroff Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, n. 5, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, D. E. Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 31, n. 4, p. 230-314, 1967.

BRODGEN, A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BURKHOLDER, W. H. Three bacterial plant pathogens. *Phytomonas caryophylli* sp.n., *Phytomonas alliicola* sp.n. and *Phytomonas manihotis* (Artaud, Berthet and Bondar) Viegas. **Phytopathology**, Lancaster, v. 32, p. 141-149, 1942.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, p. 115-117, 1950.

CABOCHE, S.; PUPIN, M.; LECLÈRE, V.; JACQUES, P.; KUCHEROV, G. Structural pattern matching of nonribosomal peptides. **BMC Structural Biology**, London, v. 9, p. 1-15, 2009.

CABOCHE, S.; PUPIN, M.; LECLERE, V.; FONTAINE, A.; JACQUES, P.; KUCHEROV, G. NORINE: a database of nonribosomal peptides, **Nucleic Acids Research**, London, v.36, Database issue D326-D331, 2008.

CASJENS, S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 27-300, 2003.

CHAN, Y. C.; BIAN, H. S.; TAN, T. M. C.; MATTMANN, M. E.; GESKE, G. D.; IGARASHI, J.; HATANO, T.; SUGA, H.; BLACKWELL, H. E.; CHUA, K. L. Control of Quorum Sensing by a *Burkholderia pseudomallei* Multidrug Efflux Pump. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 189, n. 1, p. 4320-4324, 2007.

CHATTERJEE, C.; PAUL, M.; XIE, L.; van der DONK, W.A. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 105, n. 2, p. 633-684, 2005.

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

CHERIF, A.; CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 990-1000, 2003.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; VAN DEN BROEK, D.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 sigma regulator psrA represses the production of the antifungal metabolite phenazine-1-carboxamide. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 3, p. 244-253, 2005.

CHUANG, D. -Y.; CHIEN, Y. -C.; WU, H. -P. Cloning and Expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* Gene Encoding the Low-Molecular-Weight Bacteriocin Carocin S1. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 189, n. 2, p. 620-626, 2007.

CHUGH, J. K.; WALLACE, B. A. Peptaibols: models for ion channels. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 29, n. 4, p. 565-570, 2001.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. Nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of System and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 4, p. 1481-1490, 2001.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; AIT-BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1685-1693, 2005.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLEMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 607-626, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_cana_10.pdf> Acesso em: 20 maio 2010.

CUPPELS, D. A.; HANSON, R. S.; KELMAN, A. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 109, p. 295-303, 1978.

CURSINO, L. **Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina L de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico**. 2005. 121p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CURSINO, L.; SMARDA, J.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 187-197, 2002.

DAMASKO, C.; KONIETZNY, A. ; KASPAR, H. ; APPEL, B. ; DERSCH, P. ; STRAUCH, E. Studies of the Efficacy of Enterocolitacin, a Phage-Tail Like Bacteriocin, as Antimicrobial Agent Against *Yersinia enterocolitica* Serotype O3 in a Cell Culture system and in mice. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 19, n. 2, p. 171-179, 2005.

DAS, M.; GANGULY, T.; CHATTORA, P.; CHANDA, P. K.; BANDHY, A.; LEE, C. Y.; SAU, S. P. Purification and Characterization of Repressor of Temperate *S. aureus* Phage ϕ 11. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 740-748, 2007.

DE JONG, A.; VAN HIJUM, S. A. F. T.; BIJLSMA, J. J. E.; KOK, J.; KUIPERS, O. P. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, n. 1, p. 273-279, 2006.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 1, n. 4, p. 259-264, 1998.

DERAZ, S. F.; KARLSSON, E. N.; HEDSTROMA, M.; ANDERSSON, M. M.; MATTIASSON, B. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 117, p. 343-354, n. 4, 2005.

DIAZ-PEREZ, C.; CERVANTES, C.; CAMPOS-GARCIA, J.; JULIAN-SANCHEZ, A.; RIVERS-ROSAS, H. Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily, **FEBS Journal**, Oxford, v. 274, n. 23, p. 6215-6227, 2007.

DIVAN-BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

DUONG, C. T. P.; LEE, H. N.; CHOI, S. S.; LEE, S. Y.; KIM, E. S. Functional Expression of SAV3818, a Putative TetR-Family Transcriptional Regulatory Gene from *Streptomyces avermitilis*, Stimulates Antibiotic Production in *Streptomyces* Species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 2, p. 136-139, 2009.

DUPUY, B.; MATAMOUROS, S. Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase σ -factors. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 3, p. 201-205, 2006.

EIJSSINK, V. G. H.; AXELSSON, L.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of Genetics and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 81, p. 639-654, 2002.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VUURDE, J. W. L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 11, p. 1036-1041, 2000.

ERB, A.; WEIß, H.; HARLE, J.; BECHTHOLD, A. A bacterial glycosyltransferase gene toolbox: Generation and applications. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n.15-16, p. 1812-1821, 2009.

ESTRADA-DE LOS-SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.

ESTRADA-DE LOS-SANTOS, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 4, p. 285-294, 2002.

FERNANDEZ, E.; WEIBBACH, U.; REILLO, C. S.; BRANA, A. F.; MENDEZ, C.; ROHR, J.; SALAS, J. A. Identification of Two Genes from *Streptomyces argillaceus* Encoding Glycosyltransferases Involved in Transfer of a Disaccharide during Biosynthesis of the Antitumor Drug Mithramycin. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 180, n. 18, p. 4929 - 4937, 1998.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

FREY, P.; SMITH, J. J.; ALBAR, L.; PRIOR, P.; SADDLER, G. S.; TRIGALET-DEMERY, D.; TRIGALET, A. Bacteriocin Typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* Race 1 of the French West Indies and Correlation with Genomic Variation of the Pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 473-479, 1996.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 117-128, 1999.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, J. R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 43-50, 1998.

GILLIS, M., VANVAN, T., BARDIN, R., GOOR, M., HEBBAR, P., WILLMEMS, A., SEGERS, P., KERSTERS, K. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 274-289, 1995.

GONG, H.; BYERS, D. M. Glutamate-41 of *Vibrio harveyi* acyl carrier protein is essential for fatty acid synthase but not acyl-ACP synthetase activity, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 302, n. 1, p. 35-40, 2003.

GONZALEZ, C. F.; VIDAVER, A. K. Bacteriocin, plasmid and pectinolytic diversity in *Pseudomonas cepacia*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 110, n. 1, p. 161-170, 1979.

- GOVAN, J. R. W.; HARRIS, G. Typing of *Pseudomonas cepacia* by bacteriocin susceptibility and production. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 22, n. 4, p.490-494, 1985.
- GRAY, E. J.; LEE, K. D.; SOULEIMANOV, A. M.; Di FALCO, M. R.; ZHOU, X.; LY, A.; CHARLES, T. C.; DRISCOLL, B. T.; SMITH, D. L. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 545-554, 2006.
- GRGURINA, I.; BENSACI, M.; POCSFALVI, G.; MANNINA, L.; CRUCIANI, O.; FIORE, A.; FOGLIANO, V.; SORENSEN, K. N.; TAKEMOTO, J. K.; Novel cyclic lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 508 and syringopeptin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 12, p. 5037-5045, 2005.
- GRISTWOOD, T.; FINERAM, P. C.; EVERSON, L.; SALMOND, G. P. C. PigZ, a TetR/AcrR family repressor, modulates secondary metabolism via the expression of a putative four-component resistance-nodulation-cell-division efflux pump, ZrpADBC, in *Serratia* sp. ATCC 39006. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 418-435, 2008.
- GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K. Bacteriocin-Like Substances Produced by *Rhizobium japonicum* and Other Slow-Growing Rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 936-943, 1978.
- GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K. Bacteriocins. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C. (Ed.), **Methods in Phytobacteriology**, Budapest: Akademiai Kiado, 1990. p. 245-249.
- GU, G.; SMITH, L.; WANG, N.; WANG, H.; LU, S. -E. Biosynthesis of an antifungal oligopeptide in *Burkholderia contaminans* strain MS14. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 380, n. 2, p. 328-332, 2009.
- GUILHABERT, M. R.; HOFFMAN, L. M.; MILLS, D. A.; KIRKPATRICK, B. C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes molecular. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 6, p. 701-706, 2001.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.
- HAFEEZ, F. Y.; NAEEM, F. I.; NAEEM, R.; ZAIDI, A. H.; MALIK, K. A. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad. **Environmental and Experimental Botany**. Oxford, v. 54, n. 2, p. 142-147, 2005.

HAGGARD-LJUNGQUIST, E.; JACOBSEN, E.; RISHOVD, S.; SIX, E. W.; NILSSEN, O.; SUNSHINE, M. G.; LINDQVIST, B. H.; KIM, K. -J., BARREIRO, V.; KOONIN, E. V.; CALENDAR, R. Bacteriophage P2: Genes involved in baseplate assembly. **Virology**, New York, v. 213, n. 1, p. 109-121, 1995.

HAMMAMI, A.; RHOUMA, B.; JAOUADI, A.; 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**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 253-260, 2009.

HAMLIN, J. N.; BLOODWORTH, R. A.; CARDONA, S. T.; Regulation of phenylacetic acid degradation genes of *Burkholderia cenocepacia* K56-2. **BMC Microbiology**, London, v. 9, p. 222, 2009.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

HE, L.; CHEN, W.; LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**, Washington, v. 161, n. 4, p. 321-326, 2006.

HEU, S.; OH, J.; KANG, Y.; RYU, S.; CHO, S. K.; CHO, Y.; CHO, M. *gly* Gene Cloning and Expression and Purification of Glycinecin A, a Bacteriocin Produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4105-4110, 2001.

HEUNGENS, K.; PARKE, J. L. Postinfection Biological Control of Oomycete Pathogens of Pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, n. 4, p. 383-391, 2001.

HOLDEN, M. T. G.; SETH-SMITH, H. M. B.; CROSSMAN, L. C.; SEBAIHIA, M.; BENTLEY, S. D.; CERDENO-TARRAGA, A. M.; THOMSON, N. R.; BASON, N.; QUAIL, M. A.; SHARP, S.; CHEREVACH, I.; CHURCHER, C.; GOODHEAD, I.; HAUSER, H.; HOLROYD, N.; MUNGALL, K.; SCOTT, P.; WALKER, D.; WHITE, B.; ROSE, H.; IVERSEN, P.; MIL-HOMENS, D.; ROCHA, E. P. C.; FIALHO, A. M.; BALDWIN, A.; DOWSON, C.; BARRELL, B. G.; GOVAN, J. R.; VANDAMME, P.; HART, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; PARKHILL, J. The Genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an Epidemic Pathogen of Cystic Fibrosis Patients. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 191, n. 1, p. 261-277, 2009.

HOLTSMARK, I.; EIJSINK, V. G. H.; BRURBERG, M. B. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 280, n. 1, p. 1-7, 2008.

HOLTSMARK, I.; MANTZILAS, D.; EIJSINK, V. G. H.; BRURBERG, M. B. The tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: producer of several antimicrobial substances. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 416-423, 2007.

HURST, M. R. H.; BEARD, S. S.; JACKSON, T. A.; JONES, S. M. Isolation and characterization of *Serratia entomophila* antifeeding prophage. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 42-48, 2007.

JABRANE, A.; SABRI, A.; COMPERE, P.; JACQUES, P.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; THENART, P. Characterization of serracin P, a phage tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5704-5710, 2002.

JACOB, F. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanaea*. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v. 86, n. 2, p. 149-160, 1954.

JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVICH, A.; WOLLMAN, E. Définition de quelques terms relatifs à la lysogénie. **Annales de L'Institut Pasteur**, Paris, v. 84, n. 3, p. 222-224, 1953.

JENG, W. Y.; KO, T. P.; LIU, C. I.; GUO, R. T.; LIU, C. L.; SHR, H. L.; WANG, A. H. Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 36, n. 5, p. 1567-1577, 2008.

JENKE-KODAMA, H.; DITTMANN, E. Evolution of metabolic diversity: Insights from microbial polyketide synthases. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n. 15-16, p. 1858-1866, 2009.

JIN, M.; WRIGHT, S.; BEER, S.; CLARDY, J. The biosynthetic gene cluster of pantocin A provides insights into biosynthesis and a tool for screening. **Angewandte Chemie International Edition**, New York, v. 42, n. 25, p. 2902-2905, 2003.

KABUKI, T.; UENISHI, H.; WATANABE, M.; SETO, Y.; NAKAJIMA, H. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 4, p. 971-980, 2007.

KAMOUN, F.; FGUIRA, I. B.; TOUNSI, A.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; JAOUA, S. Generation of Mini-Tn10 transposon insertion mutant library of *Bacillus thuringiensis* for the investigation of genes required for its bacteriocin production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 294, n. 2, p. 141-149, 2009.

KAMOUN, F.; MEJDOUB, H.; AOUISSAOUI, H.; REINBOLT, J.; HAMMAMI, A.; JAOUA, S. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 881-888, 2005.

KANG, S.; MILLS, A. L. Soil Bacterial Community structure changes following disturbance of the overlying plant community. **Soil Science**, New Brunswick, v. 169, n. 1, p. 55-65, 2004.

KAPITONOV, D.; YU, R. K. Conserved domains of glycosyltransferases. **Glycobiology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 961-978, 1999.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 1, p. 24-30, 1980.

KILBANE J. J.; CHATTERJEE, D. K; CHAKRABARTY, A. M. Detoxification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 45, n. 5, p. 1697-1700, 1983.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-45, 1993.

KLEINKAUF, H.; Von DOHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 236, p. 335-351, 1996.

KOLTER, R.; INUZUKA, M.; HELINSKI, D. R. Trans-complementation dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. **Cell**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 1199-1208, 1978.

KOLTER, R.; MORENO, F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p. 141-161, 1992.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. J. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 9, p. 3160-3165, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUTTER, S.; HARTMANN, A.; SCHMID, M. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 262-271, 2006.

- LANGE, B. M.; RUJAN, T.; MARTIN, W.; CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 24, p. 13172-13177, 2000.
- LAVERMICOCCA, P.; LONIGRO, S. L.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; VISCONTI, A. Reduction of Olive Knot Disease by a Bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. Ciccaronei. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1403-1407, 2002.
- LEE, H. N.; HUANG, J.; IM, J. H.; KIM, S. H.; NOH, J. H.; COHEN, S. N.; KIM, E. S. Putative TetR family transcriptional regulator SCO1712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 9, p. 3039-3043, 2010.
- LEWUS, C.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 14, n. 1, p.145-150, 1991.
- LIM, Y. H.; SUH, J. W.; KIM, C. W.; HYUN, B. C.; KIM, C. S.; LEE, C. H. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. II. Physicochemical properties and structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 47, p. 1406-1416, 1994.
- LISBOA, M. P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J. A. P.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 9, n. 2, p.111-118, 2006.
- LLOYD, D. H.; LAMPORT, A.; PARKER, W. L.; RATHNUM, M. L.; SEINER, V.; TREJO, W. H.; PRÍNCIPE, P. A.; SYKES, R. B. Cepacin A e Cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 37, n. 5, p. 431-440, 1984.
- LUVIZOTTO, D.M. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 94p. (Mestrado em Agronomia) - – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. D.; ANDREOTE, F. D.; NEVES, A. A. C.; ARAUJO, W. L. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 2010.
- McDONNELL, G. E.; McCONNELL, D. J. Overproduction, Isolation, and DNA-Binding Characteristics of Xre, the Repressor Protein from the *Bacillus subtilis* Defective Prophage PBSX, **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, n. 18, p. 5831-5834, 1994.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, n. 6, p.1539-1551, 2008.

MARCON, J. **Efeito de cana de açúcar geneticamente modificada sobre comunidades bacterianas**. 2007. 96p. (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MAREKOVA, M.; LAUKOVA, A.; SKAUGE, M. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v.34, n. 8, p.533-537, 2007.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1339-1345, set. 2002.

MARKOWITZ, V. M.; KORZENIEWSKI, F.; PALANIAPPAN, K.; SZETO, E.; WERNER, G.; PADKI, A.; ZHAO, X.; DUBCHAK, I.; HUGENHOLTZ, P.; ANDERSON, I.; LYKIDIS, A.; MAVROMATIS, K.; IVANOVA, N.; KYRPIDES, N. C. The integrated microbial genomes (IMG) system. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, D. 344-348, 2006.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 12, p. 1137-1147, 2005.

MARTIN, F. A.; POSADAS, D. M.; CARRICA, M. C.; CRAVERO, S. L.; O'CALLAGHAN, D.; ZORREGUIETA, A. Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Balimore, v. 191, n. 8, p.2530-2540, 2009.

MARTINEZ, J. L.; SANCHEZ, M. B.; MARTINEZ-SOLANO, L.; HERNANDEZ, A.; GARMENDIA, L.; FAJARDO, A.; ALVAREZ-ORTEGA, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 430-449, 2009.

MAVRODI, D. V.; LOPER, J. E.; PAULSEN, I. T.; THOMASHOW, L. S. Mobile genetic elements in the genome of the beneficial rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **BMC Microbiology**, London, v. 9, n. 8, p. 1-18, 2009.

MENARD, A.; MONNEZ, C.; SANTOS, P. E.; SEGONDS, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; LIPUMA, J. J.; CHABANON, G.; COURNOYER, B. Selection of nitrogen-fixing deficient *Burkholderia vietnamiensis* strains by cystic fibrosis patients: involvement of *nif* gene deletions and auxotrophic mutations, **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 9, n. 5, p. 1176-1185, 2007.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MENDES, R. **Diversidade de caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas a cana de açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MICHEL-BRIAND, Y; BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5-6, p. 499–510, 2002.

MINOWA, Y.; ARAKI, M.; KANEHISA, M. Comprehensive analysis of distinctive polyketide and nonribosomal peptide structural motifs encoded in microbial genomes. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 368, n. 5, p.1500-1517, 2007.

MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, n. 2, p. 159-167, 2000.

MONTESINOS, E. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p.1-11, 2007.

NAKATA, P. A. The generation of a transposon-mutagenized *Burkholderia glumae* library to isolate novel mutants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 267-271, 2002.

NANDINENI, M. R.; LAISHRAM, R. S.; GOWRISHANKAR, J. Osmosensitivity associated with insertions in *argP (iciA)* or *glnE* in Glutamate synthase-deficient mutants of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, n. 19, p. 6391-6399, 2004.

NGUYEN, H. A.; TOMITA, T.; HIROTA, M.; SATO, T.; KAMIO, Y. A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* Er. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.63, p.1360-1369, 1999.

NIES, D. H.; KOCH, S.; WACHI, S.; PEITZSCH, N.; SAIER JR., M. H. CHR, a Novel Family of Prokaryotic Proton Motive Force-Driven Transporters Probably Containing Chromate/Sulfate Antiporters, **Journal of Bacteriology**, Baltimore, p.5799-5802, 1998.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, London, v. 135, n. 4, p.723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, V. M. **Produção de bacteriocina por *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: detecção, caracterização e potencial para proteção de plantas.** 224p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 1992.

PARRET, A. H. A.; DE MOT, R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other gamma-proteobacteria. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, p. 107-112, 2002.

PARRET, A. H. A.; TEMMERMAN, K.; DE MOT, R. Novel Lectin-Like Bacteriocins of Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, n. 9, p. 5197-5207, 2005.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações.** 2^a ed., São Paulo: MAKRON Books, 1996. v. 2, 1072p.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BLADANI, J. I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, 2006.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico.** 2006. 141p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PILLAY, V. K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 354-361, 1997.

PIÑÓN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocina against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, n. 6, p. 345-351, 2002.

POMPEANI, A. J.; IRGON, J. J.; BERGER, M. F.; BULYK, M. L.; WINGREEN, N. S.; BASSLER, B. L. The *Vibrio harveyi* master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 76-88, 2008.

PUGSLEY, A. P.; OUDEGA, B. Methods of studying colicinas and their plasmids. In: HARDY, K.G. (Ed.) **Plasmids, a practical approach**, Oxford: IRL Press-Oxford University Press, 1987. p.105-161.

PUTRA, S. R.; DISCH, A.; BRAVO, J. -M.; ROHMER, M. Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some Gram-negative bacteria and mycobacteria, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.164, n. 1, p.169-175, 1998.

PYE, V. E.; TINGEY, A. P.; ROBSON, R. L.; MOODY, P.C.E. The Structure and Mechanism of Serine Acetyltransferase from *Escherichia coli*, **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 39, p. 40729-40736, 2004.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 254-259, 1997.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJIN, I.; DE KOCK, M. J. D. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* ssp: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.19, n. 7, p.699–710, 2006.

RAMOS, J. L.; MARTINEZ-BUENO, M.; MOLINA-HENARES, A. J.; TERA, W.; WATANABE, K.; ZHANG, X.; GALLEGOS, M. T.; BRENNAN, R.; TOBES, R. The TetR family of transcriptional repressors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, n. 2, p.326-356, 2005.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3 ed., Washington: CRC Press, 2003. 624p.

REEVES, P. The bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 29, n. 1, p. 24-45, 1965.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, T.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMAN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, 2004.

RIEDEL, K.; TALKER-HUIBER, D.; GIVSKOV, M.; SCHAWAB, H.; EBER, L. Identification and Characterization of a GDSE Esterase Gene Located Proximal to the *swr* Quorum-Sensing System of *Serratia liquefaciens* MG1, **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 7, p. 3901-3910, 2003.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.117-137, 2002.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M.; MONTVILLE, T. J.; CHIKINDAS, M. L. Purification and mechanistic action of a bacterocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sake* 2a. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 22, n. 1, p. 39-54, 2002.

ROSSETTO, P. B. **Interações entre cana de açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ROUWS, L. F. M.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 189, n. 3, p. 397-405, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 765p., 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344p., 2001.

SANTANGELO, M. P.; KLEPP, L.; NUNEZ-GARCIA, J.; BLANCO, F. C.; SORIA, M. GARCIA-PELAYO, M. C.; BIANCO, M. V.; CATALDI, A. A.; GOLBY, P.; JACKSON, M.; GORDON, S. V.; BIGI, F. Mce3R, a TetR-type transcriptional repressor, controls the expression of a regulon involved in lipid metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, Reading, v. 155, n. 7, p. 2245-2255, 2009.

SAVOIA, D.; ZUCCA, M. Clinical and environmental *Burkholderia* strains: biofilm production and intracellular survival. *Current Microbiology*, v. 54, p. 440-444, 2007.

SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M.A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. **Naturwissenschaften**, Heidelberg v. 88, n. 3, p. 93-101, 2001.

SCHMIDT, S.; BLOM, J. F.; PERNTHALER, J.; BERG, G.; BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; EBERI, L. Production of antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 11, n. 6, p. 1422-1437, 2009.

SHELLENBERG, B.; BIGLER, L.; DUDLER, R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 9, n. 7, p. 1640-1650, 2007.

SEO, S. -T.; FURUYA, N.; IYAMA, K.; TAKESHITA, M.; TAKANAMI, Y.; TSUCHIYA, K.; LIM, C. -K. Characterization of an antibacterial substance produced by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ecc32. **Journal of General Plant Pathology**, Dordrecht, v. 70, p. 273-277, 2004.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A. V.; VANDAMME, P.; BARKA, E. A.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B. R. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1187-1192, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 23-32, 2002.

SHINOMYIA, T.; OSUMI, M.; KAGEYAMA, M. Defective pyocin particles produced by some mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 124, n. 3, p. 1508-1521, 1975.

SONAWANE, A. M.; ROHM, K. H. A functional gltB gene is essential for utilization of acidic amino acids and expression of periplasmic glutaminase/asparaginase (PGA) by *Pseudomonas putida* KT2440. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 271, n. 1, p. 33-39, 2004.

SOUZA, E. L.; SILVA, C. A.; SOUSA, C. P. Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 559-566, 2005.

STRAUME, F.; KJOS, M.; NES, I. F.; DIEP, D. B. Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 278, n. 3, p. 283-293, 2007.

SUN, G. W.; CHEN, Y.; LIU, Y.; TAN, G. -Y. G.; ONG, C.; TAN, P.; GAN, Y. -H. Identification of a regulatory cascade controlling type III secretion system 3 gene expression in *Burkholderia pseudomallei*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 76, n. 3, p. 677-689, 2010.

SUN, Q.; WU, W.; QIAN, W.; HU, J.; FANG, R.; HE, C. High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, n. 1, p. 145-150, 2003.

SURETTE, M. A.; STURTZ, A. V.; LADA, R. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 2, p. 381-390, 2003.

TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; CHIARINI, L. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview **Annals of Microbiology**, Milan, v. 52, p.103-117, 2002.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TIAN, T.; WU, X. -G.; DUAN, H. -M.; ZHANG, L. -Q. The resistance-nodulation-division efflux pump EmhABC influences the production of 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. **Microbiology**, Reading, v.156, n. 1, p.39-48, 2010.

TSENG, C. C.; McLOUGHLIN, S. M.; KELLEHER, N. L.; WALSH, C. T. Role of the Active Site Cysteine of DpgA, a Bacterial Type III Polyketide Synthase **Biochemistry**, Washington, v. 43, n. 4, p. 970-980, 2004.

TUDOR-NELSON, S. M.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; JONES, J. B. Bacteriocin-Like Substances from Tomato Race 3 Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 93, n. 11, p. 1415-1421, 2003.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J. J.; SPEERT, D. P.; GOVAN, J. R. et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 143-149, 2002.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J.; GOVAN, J.R. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.– a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 91-96, 2003.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S. et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, n. 4, p. 1188-1200, 1997.

VANDAMME, P.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HOLMES, B.; COENYE, T.; HOSTE, B.; DE VOS, P.; HENRY, D.; SPEERT, D. P. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1042-1047, 2000.

VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J; BALDWIN, A.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 7, 1580-1590, 2008.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 1, p. 102-111, 2009.

VANONI, M. A.; CURTI, B. Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 55, n. 4, p. 617-638, 1999.

VERMIS, K.; COENYE, T.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 3, p. 689-691, 2004.

VIAL; LUDOVIC; GROLEAU, M. -C.; DEKIMPE, V.; DÉZIEL, E. *Burkholderia* Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular Products. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 17, n. 9, p. 1407-1429, 2007.

WANG, C. -L.; XU, A. -B.; GAO, Y.; FAN, Y. -L.; LIANG, Y. -T.; ZHENG, C. -K.; SUN, L. -Q.; WANG, W. -Q.; ZHAO, K. -J. Generation and characterisation of Tn5-tagged *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* mutants that overcome Xa23-mediated resistance to bacterial blight of rice. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 3, p. 343-351, 2009.

WATANABE, K.; PRASEUTH, A.; WANG, C. C. C. A comprehensive and engaging overview of the type III family of polyketide synthases, **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.11, n. 3, p. 279-286, 2007.

WEI, H. -L.; ZHANG, L. -Q. Quorum sensing system influences rot colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 89, n. 2, p. 267-280, 2006.

WHEELER, D. L.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; GEER, L. Y.; KAPUSTIN, Y.; KHOVAYKO, O.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L.; MAGLOTT, D. R.; OSTELL, J.; MILLER, V.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SIROTKIN, K.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOV, R. L.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; YASCHENKO, E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, D5-D12, 2007.

WILLIAMS, S. R.; GEBHART, D.; MARTIN, D. W.; SCHOLL, D. Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, n. 12, p. 3868-3876, 2008.

WINSOR, G. L.; KHAIRA, B.; ROSSUM, T. V.; LO, R.; WHITESIDE, M. D.; BRINKMAN, F. S. The *Burkholderia* Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses, **Bioinformatics**, Oxford, v. 24, n. 23, p. 2803-2804, 2008.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARARKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni et Holmes 1981) com. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, p. 897-904, 1992.

YAMADA, K.; HIROTA, M.; NIIMI, Y.; NGUYEN, H. A.; TAKAHARA, Y.; KAMIO, Y.; KANEKO, J. Nucleotide sequences and organization of the genes for carotovoricin (Ctv) from *Erwinia carotovora* indicate that Ctv evolved from the same ancestor as *Salmonella typhi* prophage. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Japan, v. 70, n. 9, p. 2236-2247, 2006.

ZAKI, K.; MISAHI, I. J.; HEYDARI, A. Control of Cotton Seedling Damping-off in the Field by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 3, p. 291-293, 2001.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.