

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

**PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE *Bacillus* spp. CONTRA
Xanthomonas campestris pv. *campestris***

Recife – 2002

Leila Monteiro

**PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE *Bacillus* spp. CONTRA
Xanthomonas campestris pv. *campestris***

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM BIOTECNOLOGIA.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadores: Profa. Dra. Ana Maria Souto

Maior Profa. Dra. Rosa de Lima Mariano

Recife - 2002

DEDICO

A meus pais, Helena e Geraldo e
minha irmã, Silvia, pelo carinho
e apoio durante a realização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

1 A Deus pela oportunidade e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha família pelo crédito de confiança, incentivo e paciência.

Às professoras Dra. Ana Maria Souto Maior e Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, pela orientação prestada durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Antibióticos da UFPE, Alda, Fátima Queiroz, Janete Magali, Késia, Márcia Nascimento, Glícia Calazans, Maria do Carmo, Suely Galdino, Ivan Pitta, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos técnicos e estagiários do laboratório de coleção microbiana, Clécia, Fátima Regina, Orlando, Gerson, Carlos, Zeca, Tati, Tereza, Márcio Luiz, Rita, Dani, Paulo, Alberto e Luciane, pelo carinho e ajuda prestadas durante essa caminhada.

A todos os funcionários do Departamento de Antibióticos, pela atenção, carinho e serviços prestados.

A todos os colegas do mestrado, meu abraço sincero.

Às amigas incondicionais que estiveram sempre ao meu lado, Gláucia e Ivanilda, pelos conselhos e por todos os momentos que passamos juntas.

A Jefferson, acima de tudo um grande amigo e companheiro de todas as horas, pelo carinho e principalmente pela paciência, um forte abraço.

À Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

"A certeza tranqüila de ser capaz de chegar onde quiser, torna cheia de emoção a vida do vencedor;

Sucesso é nem pensar em desistir quando todas as dificuldades do mundo cercarem-no por todos os lados;

É você se sentir, intensamente, explodindo de entusiasmo sem dar a mínima atenção às coisas negativas que tentam, em vão, puxá-lo para baixo;

É você compartilhar seu amor com os outros e acreditar no amor dos outros por você; é sonhar alto, trabalhar sem medir esforços, e manter suas metas sempre totalmente nítidas; é ser generoso, atencioso e nobre em tudo o que fizer;

Em suma, o sucesso não é algo que se atinge e sim aquilo que você é."

(Bob Andrews)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Controle Biológico.....	3
2.2 <i>Bacillus</i> spp. como Agentes no Biocontrole	8
2.3 Produção de Antibióticos Peptídicos por <i>Bacillus</i> spp.	11
2.4 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> e a Podridão Negra das Crucíferas	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Microrganismos	22
3.2 Meios de Cultura	22
3.2.1. Meio AN (Ágar-Nutritivo).....	22
3.2.2. Meio 523 (KADO, HESKETT, 1970)	23
3.2.3. Meio YM (“Yeast-Malt”).....	23
3.2.4. Meio Ágar Sangue (AS).....	23
3.2.5. Meio de Fermentação.....	24
3.3 Procedimento Experimental.....	24
3.3.1. Atividade Antagônica de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	24
3.3.2. Atividade Hemolítica de <i>Bacillus</i> spp.	25
3.3.3. Fermentação para Produção de Substâncias Bioativas por <i>Bacillus</i> spp.	26
3.3.4. Análises Estatísticas	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Atividade Antagônica de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ..	32
4.2 Atividade Hemolítica de <i>Bacillus</i> spp.	36
4.3 Fermentação para Produção de Substâncias Bioativas por <i>Bacillus</i> spp.	43
4.3.1. Curvas de Crescimento e Formação de Produtos Bioativos	43
4.3.2. Produção de Substâncias Tensoativas.....	49
5. CONCLUSÕES	56
6. SUGESTÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura de lipopeptídeos produzidos por algumas espécies de <i>Bacillus</i> spp.....	12
Figura 2.2 - Mecanismo multienzimático de produção de lipopeptídeos.....	14
Figura 2.3 - Podridão negra das crucíferas: (A) cultivo de couve com sintomas da doença causada por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ; (B) lesões em forma de “V” em folha de couve, com amarelecimento do tecido e necrose.....	20
Figura 3.1 – Fluxograma de tratamento das amostras para acompanhar o crescimento celular, consumo de glicose e atividade antimicrobiana ao longo da fermentação.....	29
Figura 3.2 – Fluxograma de tratamento das amostras para análise de tensão superficial ao longo da fermentação e isolamento de biossurfactantes.....	30
Figura 4.1 - Atividade antimicrobiana de <i>Bacillus</i> spp. contra: (A) linhagens C3, C4 e C8; (B) C10, C11 e C12 e (C) C18, S2 e S6 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	33
Figura 4.2 -Atividade hemolítica de <i>Bacillus</i> spp., com leituras a 24, 48 e 72 horas, obtidas em temperatura de: (A) 30°C e (B) 37°C.....	38
Figura 4.3 - Atividade hemolítica obtida após 72 horas em temperatura de 30° C e 37° C por <i>Bacillus</i> spp.....	39
Figura 4.4 - Relação entre atividade hemolítica após 72 horas a 37° C e atividade antimicrobiana de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	40
Figura 4.5 – Atividade antimicrobiana contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> dos blocos de gelose obtidos a partir do crescimento de <i>Bacillus</i> em meio ágar sangue a 37° C após 72 horas.....	42
Figura 4.6 - Curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produto bioativo contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> C10, apresentadas pelo <i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7.....	44
Figura 4.7 - Curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produto bioativo contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> C10, apresentadas por <i>Bacillus subtilis</i> R14.....	45
Figura 4.8 - Curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produto bioativo contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> C10, apresentadas por <i>Bacillus megaterium</i> C116.....	46

Figura 4.9 - Atividade antimicrobiana do líquido fermentado de: (A) <i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7, (B) <i>Bacillus subtilis</i> R14 e (C) <i>Bacillus megaterium</i> C116, ao longo da curva de crescimento.....	48
Figura 4.10 - Atividade antimicrobiana e tensão superficial do líquido fermentado de <i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7.....	53
Figura 4.11 - Atividade antimicrobiana e tensão superficial do líquido fermentado de <i>Bacillus subtilis</i> R14.....	54
Figura 4.12 - Atividade antimicrobiana e tensão superficial do líquido fermentado <i>Bacillus megaterium</i> C116.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Mecanismos de ação envolvidos no biocontrole exercidos por bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	6
Tabela 2.2 - Produtos comerciais à base de rizobactérias promotoras de crescimento e de bioproteção de plantas no mercado mundial.....	7
Tabela 3.1 - <i>Bacillus</i> epifíticos e suas origens.....	22
Tabela 4.1 - Atividade antimicrobiana dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc).....	34
Tabela 4.2 – Atividade hemolítica de <i>Bacillus</i> spp. em diferentes temperaturas.....	37
Tabela 4.3 – Tensão superficial medida no líquido fermentado, após inoculação, a 24, 48 e 72 horas de fermentação.....	50
Tabela 4.4 – Tensão superficial medida no líquido fermentado, precipitado solubilizado em água e sobrenadante a 72 horas de crescimento.....	50

RESUMO

O gênero *Bacillus* é um dos mais utilizados no biocontrole de doenças de plantas. São microrganismos encontrados facilmente em solos e plantas, que formam esporos tolerantes ao calor e à dessecação, o que facilita sua comercialização e estoque. O principal mecanismo de ação desses organismos no controle de fitopatógenos é a produção de substâncias antimicrobianas, entre as quais os lipopeptídeos, que apresentam também atividade hemolítica. Dentre os fitopatógenos que sofrem inibição por *Bacillus* spp., está a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causadora da podridão negra das crucíferas, doença de abrangência mundial, responsável por grandes perdas nas plantações de couve, repolho, nabo, rabanete, entre outras. Pesquisas anteriores mostraram que *Bacillus* spp. epifíticos, isolados de rabanete e couve, apresentam alta eficiência no controle da podridão negra em couve e repolho no campo. O presente estudo teve como objetivos a investigação de mecanismo de antibiose de oito isolados de *Bacillus*: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* pv. *cerealis* C211, *B. megaterium* C116, *Bacillus* sp. RAB9, *B. cereus* C240, *Bacillus* sp. C11 e *B. cereus* C210, contra nove linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* e a participação de lipopeptídeos neste mecanismo. Além disso, para os *Bacillus* que apresentaram resultados positivos de antibiose, foram realizados estudos de fermentação para acompanhar o crescimento e a produção de substâncias bioativas e tensoativas. Para o estudo de antibiose, foram realizados testes de atividade dos oito isolados contra as linhagens fitopatógenas de *X. campestris* pv. *campestris*, pelo método de difusão em ágar. Para verificar a produção de lipopeptídeos pelos *Bacillus*, foram realizados testes de hemólise em meio ágar sangue a 30° C e a 37° C. As fermentações foram realizadas em frascos de Fernbach, contendo 500 mL de meio de cultura a base de glicose e (NH₄)₂SO₄, em mesa agitadora, a 150 rpm e 30°C. Os testes de atividade antimicrobiana se apresentaram positivos para todas as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* frente a quatro dos isolados de *Bacillus* testados: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, os quais foram também os que apresentaram halos de hemólise, principalmente a 37° C. Os isolados, *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 se mostraram os mais eficientes no antagonismo contra as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*. A correlação observada entre a atividade antimicrobiana e a atividade hemolítica indica que lipopeptídeos estão envolvidos no mecanismo de antibiose dos isolados investigados. Nos estudos de fermentação, observou-se a produção de substâncias bioativas e surfactantes durante a fase de crescimento de *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. megaterium* C116. Assim como nos testes em meio sólido, maiores atividades antimicrobianas foram observadas nos cultivos de *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7.

ABSTRACT

The genus *Bacillus* is one of the most commonly used for the biocontrol of plant diseases. These microorganisms are easily found inhabiting soil and plants and form spores tolerant to heat and dryness, which facilitates its commercialization and stock. One of the main mechanism of action of these microorganisms in the biocontrol of phytopathogens is the production of antimicrobial substances, such as lipopeptides, which also present hemolytic activity. Among the phytopathogens inhibited by the genus *Bacillus*, it is found *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, a bacterium that causes the Black Rot of Crucifers, a worldwide problem responsible for severe damage on plantations of cabbage, kale, turnip and radish, among others. Previous researches showed that epiphytic *Bacillus*, isolated from radish and cabbage, showed high efficiency in the control of cabbage and kale black rot on field experiments. The present study aimed to demonstrate the antimicrobial mechanism of eight *Bacillus* isolates: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* pv. *cerealis* C211, *B. megaterium* C116, *Bacillus* sp. RAB9, *B. cereus* C240, *Bacillus* sp. C11 and *B. cereus* C210, against nine strains of *X. campestris* pv. *campestris* and assess the role of lipopeptides in this process. Besides, fermentation studies were performed with those isolates that demonstrated positive results in the antimicrobial activity tests to follow up the growth and production of bioactive and biosurfactant substances. In view of that, antimicrobial activity tests with the *Bacillus* isolates against the strains of *X. campestris* pv. *campestris* were performed using the agar diffusion method. Moreover hemolytic tests were realized in blood agar medium at 30° C and 37° C to verify the lipopeptide production by the *Bacillus* isolates. The fermentation was processed using Fernbach flasks, containing 500 mL of the culture medium which was prepared with glucose and (NH₄)₂SO₄ as main nutrients. The process was carried out in a counter shaker at 150 rpm and temperature of 30° C. The antibiosis tests were positive to all *X. campestris* pv. *campestris* strains against four *Bacillus* isolates: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 and *B. cereus* C210, which also demonstrated hemolytic zones in blood agar plates, mainly at 37° C. The isolates, *B. subtilis* R14 and *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 showed the most efficiency in the antagonism against *X. campestris* pv. *campestris* strains. The relation observed between the antimicrobial and hemolytic activity demonstrate that the lipopeptides are involved in the antibiosis mechanism of the antagonists studied. With respect to the fermentation studies, the production of bioactive and surfactant substances could be observed during the growth phase of *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 and *B. megaterium* C116. As observed in the tests on agar medium, *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, showed better antimicrobial activity against *X. campestris* pv. *campestris*.

1. INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas químicos tem demonstrado falhas no controle de patógenos, devido à resistência, contaminação ambiental e danos à saúde humana. Em decorrência dessas desvantagens, o uso de microrganismos no biocontrole e na promoção de crescimento de plantas, tem sido cada vez mais comum. No entanto, o sucesso do biocontrole, bem como do aumento de rendimento, depende da natureza das propriedades antagonistas e dos mecanismos de ação do organismo utilizado. Os mecanismos de ação variam grandemente, podendo ser, por exemplo, competição por nutrientes, parasitismo direto e produção de metabólitos secundários (MELO, 1998).

O gênero *Bacillus* tem sido um dos mais utilizados no biocontrole. Esse gênero compreende um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas e formadoras de endosporos. Essas estruturas são termotolerantes, resistentes à dessecação, à radiação ultravioleta e a solventes orgânicos. Essas características, associadas a capacidade de produzir antibióticos peptídicos, contribuem para que esse gênero seja utilizado no controle biológico de diversas doenças, como a ferrugem do feijoeiro e o tombamento de plântulas, além do antagonismo contra fitopatógenos, tais como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (MELO, 1998).

A bactéria *X. campestris* pv. *campestris* é o agente causador da Podridão Negra das Crucíferas, doença responsável por grandes perdas econômicas. As crucíferas constituem uma família botânica que inclui: repolho, brócolis, couve, rabanete, nabo e couve-flor, entre outras hortaliças. Membros dessa família são bastante suscetíveis à doença, que ataca plantas em qualquer estágio de desenvolvimento. A Podridão Negra ocorre com maior intensidade em ambientes com temperatura e umidade altas, sendo comum em regiões tropicais e subtropicais. Os sintomas se caracterizam por lesões amarelas em forma de “V” iniciando-se nas margens

das folhas e progredindo para o centro através do tecido vascular, resultando geralmente em necrose das folhas (ASSIS et al., 1997).

Este estudo vem aprofundar o conhecimento a respeito de um importante antagonista para a bactéria causadora da Podridão Negra das Crucíferas, o gênero *Bacillus*, visando a aplicação desse microrganismo em plantações para o controle da doença e aumento da produção. Os objetivos do trabalho foram:

- ◆ Testar a atividade antagônica *in vitro* de *Bacillus* spp. contra diversos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*.
- ◆ Verificar a relação entre antagonismo e produção de lipopeptídeos.
- ◆ Realizar estudos de fermentação para produção de substâncias bioativas dos *Bacillus* selecionados a partir dos testes de antagonismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 Controle Biológico

Tradicionalmente, o uso de pesticidas químicos tem sido bastante eficiente no controle de várias pragas que atingem plantações mundiais. Doenças, como a requeima da batata, causada por *Phytophthora infestans* (Irlanda, meados do século XIX) e a brusone do arroz, causada por *Pyricularia oryzae* (Japão, II Guerra Mundial), deixaram milhões de pessoas famintas, e, nessas ocasiões, o controle químico foi crucial (OKU, 1994). O uso prolongado de produtos químicos no tratamento de doenças de plantas, no entanto, pode provocar, além de possíveis efeitos danosos à saúde humana, o desenvolvimento de resistência por alguns fitopatógenos, provocando o uso de doses cada vez maiores e diminuindo o rendimento da produção dessas plantas.

Conseqüentemente, o controle químico tem sido repensado na agricultura mundial, no sentido de se utilizar microrganismos antagonistas como uma via alternativa no controle de doenças de plantas (HIRAOKA, 1992). Assim, foi introduzido o termo Controle Biológico, que pode ser descrito como a influência de um organismo, o antagonista, sobre outro, o patógeno, causando uma diminuição da quantidade de inóculo ou dos efeitos provocados por esse último em determinada planta hospedeira. O biocontrole é, portanto, composto por três agentes: o patógeno (que pode ser fungo, bactéria, vírus, protozoários, entre outros), a planta hospedeira e o antagonista, estando esses três componentes sob influência do meio ambiente (MARIANO et al., 2000).

O antagonista é um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais de fitopatógenos (MARIANO et al., 2000). Dentre os microrganismos antagonistas envolvidos no biocontrole, estão incluídos vários gêneros de bactérias, como, por exemplo, *Actinoplanes*,

Alcaligenes, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Rhizobium*, entre outros (WELLER, 1988). Esses organismos podem ser encontrados em diferentes partes da planta, podendo ser isolados de raízes ou regiões em torno delas (rizoplano e rizosfera, respectivamente), bem como nas folhas (filoplano) e no interior das plantas, sendo então classificados como microrganismos endofíticos (THOMSON, 1993).

O crescimento de bactérias na rizosfera e no rizoplano é bastante favorecido devido aos exsudatos liberados pelas raízes, que incluem compostos como açúcares, aminoácidos, hormônios, intermediários metabólicos e vitaminas. Em geral, os bacilos Gram-negativos são frequentemente encontrados nesse ambiente, particularmente os dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (THOMSON, 1993). Por outro lado, a superfície de folhas não fornece um ambiente tão rico e propício para a colonização de bactérias. Devido à presença de cutina e ceras, a filosfera se apresenta hidrofóbica e com uma quantidade de nutrientes limitada. Além disso, o filoplano é um ambiente inóspito para a sobrevivência microbiana devido a flutuações de temperatura e umidade e à radiação ultravioleta (THOMSON, 1993).

Portanto, a escolha do antagonista adequado depende especialmente de qual região da planta está sendo afetada pelo fitopatógeno (THOMSON, 1993). No entanto, os antagonistas podem ser aplicados em qualquer parte da planta, desde que esta seja favorável a que esses agentes se estabeleçam rapidamente e em populações suficientemente grandes e ativas para mediar a proteção da planta contra os patógenos (TOMASHOW & WELLER, 1996).

Dentre as bactérias de maior interesse no biocontrole, estão aquelas chamadas de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP). Esse termo vem sendo utilizado para descrever bactérias que podem colonizar a superfície e ou interior de plantas e estimular o crescimento destas quando aplicados em sementes, tubérculos ou raízes (CHANWAY et al, 1991). Em geral, as BPCP exercem esse efeito de forma direta quando, na ausência de fitopatógeno, elas próprias estimulam o crescimento através da produção de hormônios de

crescimento, mineralização de nutrientes, aumento de absorção de água e nutrientes e fixação de nitrogênio, ou de forma indireta, através do controle biológico. Este pode ser obtido por um ou vários mecanismos, tais como, produção de antibióticos e sideróforos, competição por espaço ou nutrientes, parasitismo, proteção cruzada e indução de resistência (LUZ, 1996; TOMASHOW & WELLER, 1996).

Em geral, esses mecanismos de ação dependem exclusivamente da bactéria antagonista utilizada. O principal mecanismo utilizado pela *Agrobacterium radiobacter* isolado 84, por exemplo, é a produção da bacteriocina agrocina 84, no entanto, essa bactéria também bloqueia o local de infecção de *A. tumefaciens*, exercendo assim uma outra forma de biocontrole, chamada exclusão de nicho (WELLER, 1988). Os principais mecanismos de biocontrole exercidos pelas BPCP são definidos na Tabela 2.1.

As BPCP abrangem um grande número de gêneros e espécies Gram-positivas e Gram-negativas. A maioria das estirpes documentada pertence aos gêneros *Pseudomonas* (Gram-negativa) e *Bacillus* (Gram-positiva). Outros gêneros também incluídos nesse grupo de bactérias são *Serratia* e *Erwinia* (Gram-negativos), *Streptomyces*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium* (Gram-positivos) (LUZ, 1996).

Vários produtos à base de BPCP têm sido comercializados com efeitos de bioproteção e aumento de crescimento de plantas. Exemplos desses produtos estão mostrados na Tabela 2.2, sendo os gêneros mais usados *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Tabela 2.1 - Mecanismos de ação envolvidos no biocontrole exercidos por bactérias promotoras de crescimento de plantas (WELLER, 1988; LUZ, 1996; SHODA, 2000).

Mecanismos de Biocontrole	
Parasitismo	Quando um organismo, o parasita, vive em associação íntima e total dependência de um outro, chamado de hospedeiro.
Proteção Cruzada	Quando uma célula é infectada por um patógeno atenuado, diminuindo a possibilidade de infecção por outro patógeno, através da “imunização”.
Antibiose	O produto metabólico de um microrganismo inibe ou suprime o crescimento de espécies patogênicas.
Competição	Quando duas espécies competem por nutrientes ou pelo espaço.
Indução de Resistência	Processo de defesa ativa da planta, induzido por agentes bióticos e que se apresenta eficiente contra uma variedade de patógenos.
Produção de Sideróforos	São compostos de baixo peso molecular queladores de ferro, produzidos sob condições limitantes desse elemento, inibindo o crescimento de patógenos.

Tabela 2.2 - Produtos comerciais à base de rizobactérias promotoras de crescimento e de bioproteção de plantas no mercado mundial (adaptado de LUZ, 1996; KLOEPPER et al., 1997; MELO, 1998).

Produto	BPCP
Galtrol A, Agrocin, Diegall	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
Quantum-4000	<i>Bacillus subtilis</i> (GB 03)
YIB (BARs)	<i>Bacillus</i> spp.
Nogall	<i>A. radiobacter</i> (K 1026)
Dagger, Conquer	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Blue Circle, Intercept	<i>P. cepacia</i>
Kodiak	<i>B. subtilis</i> (GB 03) melhorado
Kodiak Plus	<i>B. subtilis</i> + apron ¹ + terraclor ²
Deny	<i>Burkholderia cepacia</i>
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>

¹apron = fungicida à base de metalaxil (p.a).

²terraclor = fungicida à base de quintozone (p.a).

2.3 *Bacillus* spp. como Agentes no Biocontrole

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

O interesse pela utilização desses microrganismos, na promoção de crescimento e controle de doenças de plantas, começou nos anos 50, quando foi observado maior crescimento de plantas em cujas rizosferas foram aplicadas cepas desse gênero. Posteriormente, demonstrou-se que esse microrganismo também pode ser utilizado na superfície de folhas para controle biológico. Novamente, esse gênero mostrou grande vantagem por ser de mais fácil formulação e por sua capacidade de colonizar múltiplas espécies de plantas. Como exemplo, temos o controle de doenças em feijão, por *B. subtilis*, e em cebola, por *B. cereus* (BACKMAN, WILSON & MURPHY, 1997).

Diversos trabalhos foram publicados e constataram a utilidade desse microrganismo no controle de doenças de plantas. Por exemplo, LAZZARETTI & BETTIOL (1997) relataram que a utilização de pó molhável à base dessa bactéria demonstrou uma atividade semelhante ao fungicida benomil no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus* sp. e *Rhizoctonia solani*, quando aplicado em sementes de feijão. De forma semelhante, ASAKA & SHODA (1996) constataram que o caldo fermentado de *B. subtilis* RB14-C, centrifugado ou não,

diminuiu a percentagem de plantas infectadas por *R. solani*, causador do tombamento de plântulas de tomateiro. Neste mesmo trabalho, foi relatado que a produção de iturina A pelo *B. subtilis* seria responsável pela supressão da doença e que a persistência da subtilina no solo poderia contribuir sinergicamente para o efeito antifúngico da iturina A.

Igualmente, *B. subtilis* A13 apresenta atividade inibitória *in vitro* contra uma série de fitopatógenos, além de promover o crescimento de várias espécies de plantas. Esse microrganismo pode ser utilizado também no tratamento de sementes, tendo aumentado 48% da produtividade em cenouras, e mais de 37% em amendoins. Por esse motivo, o *B. subtilis* A13 tem sido comercializado para o tratamento, principalmente, de amendoins, desde 1983 (WELLER, 1988), e, desde então, vários outros produtos a base de *Bacillus* spp. já foram comercializados, especialmente na China, para aumento de produtividade, relatado em torno de 10-22%, e controle microbiológico em culturas de hortaliças, arroz, algodão, nabo e trigo (LUZ, 1996).

BAPAT & SHAH (2000) comprovaram a atividade em campo de *B. brevis* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *udum*, causador da murcha de fusário do feijão guandú. Sementes tratadas com esse antagonista tiveram o desenvolvimento dos sintomas diminuídos devido a uma substância antibiótica produzida pelo *B. brevis*. Esse antibiótico extracelular promove o engrossamento das hifas do patógeno e desenvolve alterações no citoplasma celular, deixando-o menor e granuloso, além de inibir a germinação dos conídios. CHANWAY et al (2000) avaliaram a colonização bacteriana e o crescimento de abeto híbrido (planta de importância na fabricação do papel), após inoculação de três espécies de *Bacillus* e três de *Pseudomonas*, em ambientes controlados e em campo. Neste estudo, foi comprovado que três dos microrganismos utilizados, uma espécie de *Bacillus* e duas de *Pseudomonas*, apresentaram colonização endofítica das plântulas resultando no aumento de 57% do peso seco das mesmas.

Vários são os mecanismos envolvidos no controle de doenças de plantas por *Bacillus* spp., tais como, competição por espaço e nutrientes, indução de resistência sistêmica, produção de sideróforos e antibiose, sendo este último o principal deles (TOMASHOW & WELLER, 1996). Por exemplo, a produção por *B. subtilis* de metabólitos antifúngicos voláteis, ativos contra diferentes grupos taxonômicos, demonstrou ser um importante modo de ação contra doenças causadas por *Fusarium* spp. e *Rhizotonia solani* (FIDDMAN & ROSSALL, 1994).

LEIFERT et al. (1995) estudaram duas espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* CL27 e *B. pumilus* CL45, e relataram que a atividade exercida *in vivo* contra *Botrytis cinerea* pelo *B. subtilis* CL27 era devida à produção de antibióticos peptídicos, pois mutantes dessa espécie, incapazes de produzir o antibiótico, deixavam de apresentar atividade contra esse patógeno. De forma semelhante, PICHARD et al. (1995) relataram que a atividade *in vitro* contra *X. campestris* pv. *campestris*, apresentada por *B. polymyxa*, era devido a produção de dois antibióticos peptídicos, gavaserina e satavalina.

Dentre os diversos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp., os principais responsáveis pela ação antagônica são os antibióticos peptídicos que controlam fungos e bactérias fitopatogênicas, incluindo *Erwinia amylovora*, agente da queima das rosáceas (ABO-EL-DAHAB & EL-GOORAMI, 1964) e *Uromyces phaseoli*, causador da ferrugem do feijoeiro, (BAKER & STAVELY, 1985), além de *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (MELO, 1998; PUSEY, 1989).

2.3 Produção de Antibióticos Peptídicos por *Bacillus* spp.

Nas espécies de *Bacillus*, a exaustão de nutrientes, após a fase exponencial, leva a uma série de processos que afetam sua sobrevivência em condições ambientais adversas. Esses processos incluem: indução de quimiotaxia e motilidade, síntese de enzimas degradativas, desenvolvimento de competência genética, produção de antibióticos peptídicos e, por último, esporulação (MARAHIEL, NAKANO & ZUBER, 1993).

A produção de antibióticos peptídicos é bastante importante no controle de doenças de plantas. Também chamados metabólitos secundários ou especiais, por não estarem relacionados ao crescimento do organismo produtor, esses antibióticos constituem um grupo diverso de substâncias em relação à sua forma e função. São compostos por aminoácidos, no entanto, mostram pouca semelhança com os outros polipeptídeos, tanto em relação a sua estrutura, quanto à biossíntese, pois, além de conterem aminoácidos com configuração D e possuírem, em geral, outros constituintes em sua estrutura (geralmente um β -amino ou β -hidroxi-ácido graxo), também podem sofrer modificações pós-traducionais para tornarem-se biologicamente ativos (VATER, 1986; ZUBER, NAKANO & MARAHIEL, 1993) (Figura 2.1).

Esses antibióticos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de biossíntese como (ZUBER, NAKANO & MARAHIEL, 1993):

- a) **Antibióticos de síntese ribossomal:** representados pelos lantibióticos, cujo principal mecanismo de ação é abrir canais na membrana, permitindo o efluxo de íons, metabólitos e solutos. A subtilina, subtilosina e mersacidina são exemplos de lantibióticos.

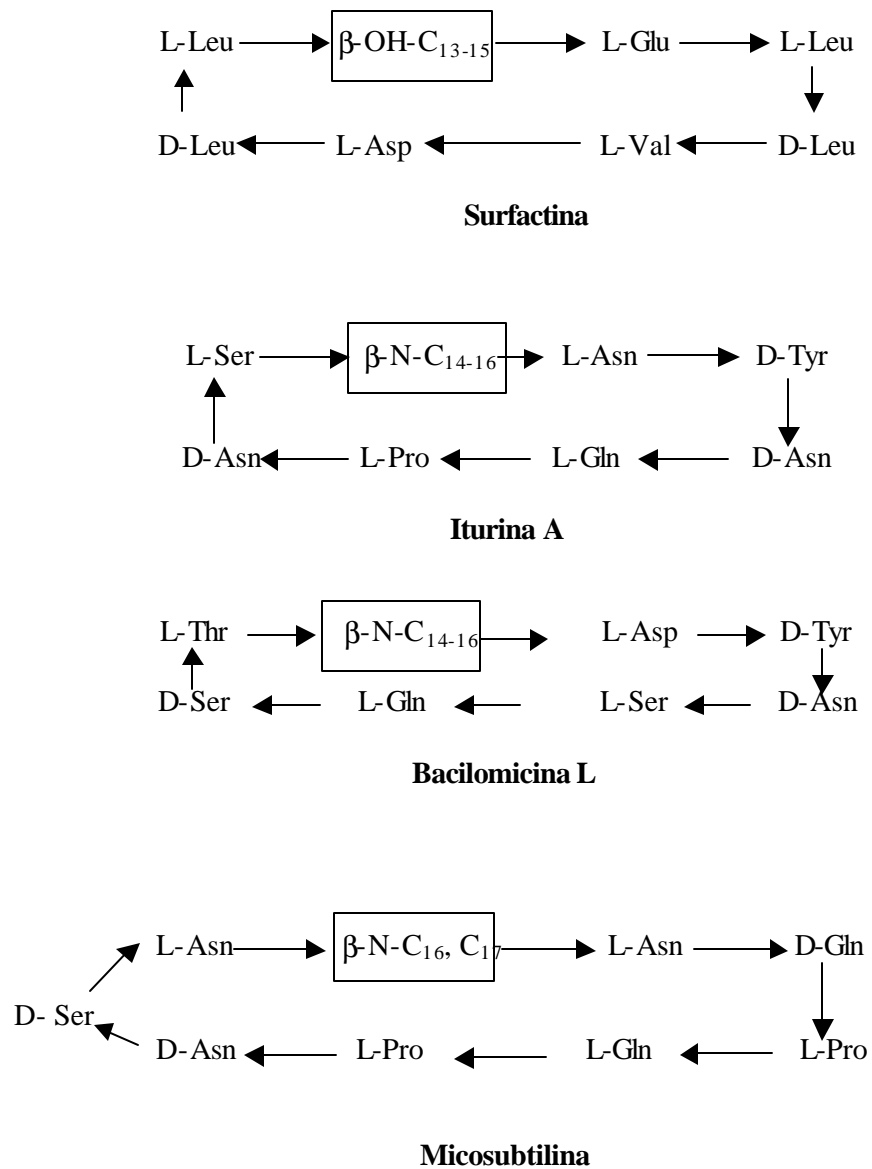


Figura 2.1 - Estrutura de lipopeptídeos produzidos por algumas espécies de *Bacillus* spp. não ribossomalmente. β -OH = β -hidroxiácido; β -N = β -aminoácido (ZUBER & MARAHIEL, 1997; VATER, 1986).

b) **Antibióticos de síntese não ribossomal:** a maioria dos lipopeptídeos são sintetizados por um mecanismo chamado Mecanismo Multienzimático ou “Thiotemplate”, o qual está sob o controle do operon *srf A* (MARAHIEL, NAKANO & ZUBER, 1993) e é composto por várias subunidades de polipeptídeos de peso molecular variando entre 100.000 e 600.000 Da (ZUBER & MARAHIEL, 1997). Esses polipeptídeos catalisam a ativação dos aminoácidos para formar acil-adenilatos, os quais vão servir de substrato para a formação de um carboxil-tioéster, através de uma ligação covalente à subunidade do complexo (Figura 2.2) (ZUBER & MARAHIEL, 1997). De acordo com esse mecanismo, os aminoácidos ligados covalentemente estão organizados na ordem de sua adição à cadeia polipeptídica. Após essa etapa, os aminoácidos são ligados entre si por ligações peptídicas, resultando na formação de um peptídeo linear, que por sua vez sofrerá ciclização ou simples remoção através de uma tioesterase (ZUBER & MARAHIEL, 1997).

Na procura por novos antibióticos peptídicos, o gênero *Bacillus* é uma excelente referência para estudo. Espécies de *Bacillus* produzem um grande número de antibióticos peptídicos, os quais são uma classe de biosurfactantes com grande interesse mundial devido a seu amplo espectro de atividades, podendo ser aplicados como antibióticos, antitumorais, antivirais, antifúngicos, imunomoduladores e inibidores enzimáticos (VATER, 1986). A maioria dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* são ativos contra bactérias Gram-positivas e alguns, como polimixina, colistina e circulina, exibem atividade contra Gram-negativas. No entanto, essas substâncias são conhecidas, principalmente, como antifúngicos, além de mostrarem uma excepcional atividade surfactante, como por exemplo, a surfactina, que é capaz de baixar a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27,9 mN/m em concentrações tão baixas quanto 0,005% (DESAI & BANAT, 1997).

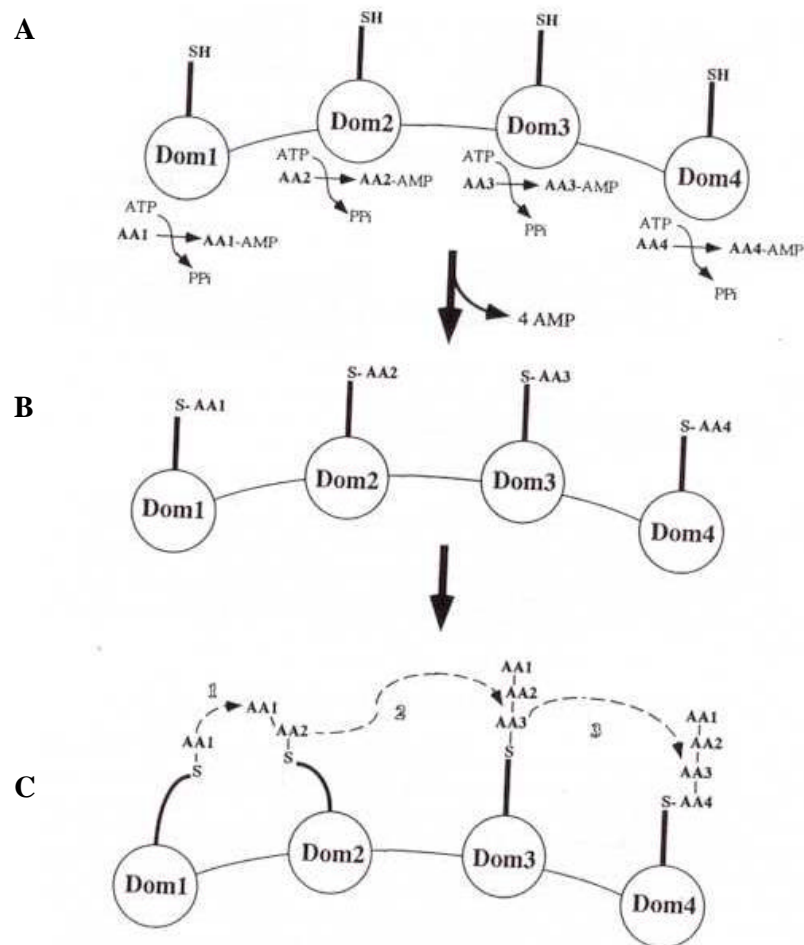


Figura 2.2 - Mecanismo multienzimático de produção de lipopeptídeos: (A) ativação dos aminoácidos com perda de uma molécula de ATP, formando acil-adenilatos; (B) os acil-adenilatos formam carboxil-tioester à subunidade do complexo com perda do AMP; (C) formação da cadeia polipeptídica através da ligação covalente entre os aminoácidos ligados à molécula de enxofre da subunidade do complexo. Dom = subunidade do complexo enzimático. (ZUBER & MARAHIEL, 1997).

Dependendo da composição do meio, a surfactina ocorre como um conjunto de variantes, chamados isoformas, que se diferenciam pela composição de aminoácidos da porção peptídica (ULLRICH et al., 1991). É uma substância anfipática, assim como todos os biosurfactantes, apresentando atividade antifúngica, antitumoral contra o carcinoma de Ehrlich, fibrinolítica, hemolítica, bem como a capacidade de lisar esferoplastos e protoplastos de várias bactérias (ULLRICH et al., 1991), e ainda atividade antiinflamatória (KIM et al., 1998).

Em relação à capacidade de destruir eritrócitos em meio ágar sangue, esta tem sido constantemente utilizada para ensaios de seleção de microrganismos produtores de surfactantes, sendo o tamanho do halo de hemólise associado com a capacidade de produção dessas substâncias (LIN, 1996), que podem ainda sofrer influência de alguns parâmetros, como, por exemplo, o pH e a cadeia hidrofóbica da molécula (número de carbonos e ramificações) (PROKOF'EVA et al., 1999).

A atividade antimicrobiana da surfactina ainda não teve seu mecanismo de ação bem elucidado. Sabe-se apenas que suas propriedades surfactante e sobre membranas aumentam a hidrofobicidade da membrana de *Bacillus*, facilitando sua adesividade sobre superfícies sólidas (VATER, 1986; AHIMOU, JACQUES & DELEU, 2000). Por outro lado, a atividade antiinflamatória da surfactina foi comprovada tanto *in vivo* quanto *in vitro* e se deve à inibição direta e seletiva da Fosfolipase A₂ citosólica (PLA₂), enzima lipolítica que hidrolisa fosfolipídios de membrana, liberando, na presença de Ca⁺², ácido araquidônico, precursor de mediadores químicos do processo inflamatório, prostaglandinas e leucotrienos (KIM et al., 1998). Por sua vez, a atividade antitumoral contra células do Carcinoma de Ehrlich foi relatada por KAMEDA et al. (1974), no caldo fermentado de *B. natto*, no qual foram encontradas duas substâncias, sendo uma delas, comprovadamente, surfactina.

Outra importante família de lipopeptídeos, produzida por algumas espécies do gênero *Bacillus*, são as iturinas, conhecidas, principalmente, por sua atividade antifúngica, devida à ação sobre a membrana citoplasmática da célula alvo, que tem sua permeabilidade a íons alterada, permitindo a saída de íons K^+ , resultando em morte celular (MAGET-DANA et al., 1992). Os lipopeptídeos pertencentes a essa família, iturina A e C, bacilomicina D, L e F e micosubtilina, tiveram sua estrutura química determinada, como visto anteriormente (SANDRIN, PEYPOUX & MICHEL, 1990). A iturina A, principal representante dessa família, foi isolada originalmente do cultivo de uma linhagem de *B. subtilis*, e apresenta, à semelhança da surfactina, um forte caráter anfipático (referente a moléculas que contêm porções hidrofílica e hidrofóbica), sendo essa a razão da sua comprovada atividade sobre as membranas celulares. Além disso, possui um amplo espectro de ação e baixa toxicidade como antifúngico (GRAU et al., 2001).

A ação conjunta da iturina A e da surfactina contra fitopatógenos foi comprovada pela comparação *in vitro* de duas linhagens de *Bacillus*. O duplo produtor, *B. subtilis* RB14, mostrou melhor atividade inibitória contra diversos fitopatógenos do que o *B. subtilis* NB22, devido à produção dessas substâncias simultaneamente, pois apesar da surfactina sozinha não inibir o crescimento de fungos fitopatógenos, a sua atividade citolítica sobre a membrana celular permitiu o ataque da iturina A, aumentando a atividade antifúngica desta (OHNO, ANO & SHODA, 1995).

A produção desses compostos pode ocorrer, dependendo do organismo produtor e da natureza do biosurfactante, (1) associada ao crescimento; (2) em condições limitantes de crescimento; (3) por células que não estão na fase de crescimento (“resting cells”) e (4) associada à adição de precursores. Em relação a espécies do gênero *Bacillus*, a produção fermentativa de agentes com atividade surfactante está normalmente associada ao crescimento desse microrganismo. Esse processo sofre ainda influência de vários fatores, dentre eles,

elementos do meio de cultura, como as fontes de carbono (glicose, glicerol, manitol e etanol, por exemplo) e de nitrogênio (como, sais de amônio e uréia) utilizadas, as quais são de grande importância no rendimento da produção desses compostos e devem ser estudadas caso por caso, para cada microrganismo (DESAI & DESAI, 1993). LEIFERT et al. (1995) constataram que tanto o pH quanto os nutrientes do meio afetaram a atividade dos antibióticos peptídicos produzidos pelo *B. subtilis* CL27 e por *B. pumilus* CL45, sendo o pH entre 5,6 e 6,0 ideal para produção de substâncias antifúngicas contra *Botrytis cinerea*, enquanto que os meios a base de couve se apresentaram melhores para produção dessas substâncias pelos *Bacillus* estudados. A temperatura, por sua vez, pode alterar a composição do biossurfactante produzido, enquanto que a transferência de oxigênio do gás para o líquido pode ser afetada pelos biossurfactantes, sendo um parâmetro chave para a otimização do processo de produção da surfactina por *B. subtilis* (DESAI & DESAI, 1993). OHNO, ANO & SHODA (1995) estudaram a produção de iturina A e surfactina por *B. subtilis* RB14 e observaram que a primeira foi produzida em maior quantidade entre temperatura de 25° C a 30° C, enquanto que a produção de surfactina foi maior a 37° C.

2.4 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e a Podridão Negra das Crucíferas

Como comentado no item 2.2, o gênero *Bacillus* apresenta atividade contra diversos fitopatógenos, dentre os quais a bactéria *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal da mais importante doença bacteriana das crucíferas, denominada Podridão Negra (ASSIS et al., 1997; LUNA et al., 2000).

A *X. campestris* pv. *campestris* é um bacilo Gram-negativo, móvel, contendo um flagelo polar e com pigmento amarelo. Essa bactéria produz uma série de enzimas extracelulares, incluindo proteases, pectinases e endogluconases, capazes de degradar componentes da matriz extracelular de plantas. Além disso, essa bactéria também produz polissacarídeos, dentre os quais a xantana é o mais importante. No entanto, de todas as enzimas citadas, apenas a protease e a xantana têm demonstrado importância no desenvolvimento da doença (OSBOURN, 1995).

A Podridão Negra é um problema mundial no cultivo de crucíferas. Membros dessa família de plantas, incluindo repolho, brócolis, couve, couve-flor, rabanete e nabo, são bastante suscetíveis à doença, que infecta plantas em qualquer estágio de desenvolvimento. A doença ocorre com maior intensidade em ambientes com temperatura entre 28° C e 30° C, e alta umidade, pela presença de água de chuva, de irrigação ou de condensação, sendo comum, e inclusive mais severa, nas regiões tropicais e subtropicais. Nessas condições, apenas uma planta infectada é suficiente para causar uma epidemia em todo o plantio (ASSIS et al., 1996b).

A bactéria pode estar presente em sementes, plantas infectadas, restos de culturas, solos e em ervas daninhas. A principal fonte, no entanto, são as sementes infectadas, que podem disseminar o patógeno a longas distâncias. Os agentes de disseminação são: água, insetos, sementes contaminadas e implementos agrícolas. A via de penetração do patógeno, geralmente, é através de poros localizados nas margens das folhas, chamados hidatódios (WILLIAMS, 1980).

O período de incubação da doença, ou seja, o número de dias entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas, varia de 7 a 20 dias, nas condições de clima tropical (COSTA, MARIANO & MICHEREFF, 2001). Os sintomas se caracterizam pelo aparecimento de lesões amarelas em forma de “V” com o vértice voltado para o centro da folha (Figura 2.3). A doença progride com a colonização das nervuras, que se tornam escurecidas, com posterior necrose de todo o tecido lesionado. O patógeno pode ainda entrar no sistema vascular e se espalhar por toda a planta, desde as folhas até as raízes através do caule (SIKORA, 1994). Em temperatura acima de 25° C, a bactéria se espalha ainda mais rápido no sistema vascular, produzindo grande quantidade de um polissacarídeo extracelular, chamado xantana, o qual juntamente com o patógeno, obstruem as veias do xilema, impedindo o fluxo de água (WILLIAMS, 1980). Em alguns casos, ainda é possível observar subdesenvolvimento, murcha, queda prematura de folhas e apodrecimento das plantas afetadas (MARINGONI, 1997).

O controle da doença consiste, usualmente, do uso de cultivares ou híbridos resistentes, controle de ervas daninhas e insetos e destruição das plantas infectadas, bem como o emprego de sementes saudáveis, pois essa bactéria pode alojar-se facilmente tanto na superfície quanto no interior de sementes. Para erradicação da bactéria em sementes recomenda-se o tratamento destas com água quente ou com antibióticos (aureomicina ou terramicina) (ASSIS et al, 1996a; MARINGONI, 1997).

O antagonismo de *Bacillus* contra *X. campestris* pv. *campestris* foi observado por ASSIS et al. (1996a), que isolaram 32 *Bacillus* spp. epifíticos de repolho, couve e rabanete. Dentre esses isolados, 13 apresentaram 100% de controle da doença em casa de vegetação, sendo o melhor período para aplicação desses epifíticos no filoplano, 3 dias antes da inoculação do patógeno. Em outro estudo, ASSIS et al. (1997) observaram que, dentre 20

A



B



Figura 2.3 – Podridão negra das crucíferas: (A) cultivo de couve com sintomas da doença causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; (B) lesões em forma de “V” em folha de couve, com amarelecimento do tecido e necrose (Fonte: www2.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/3000/3125.html)

isolados epifíticos de *Bacillus* spp., 13 apresentaram redução da severidade da podridão negra em repolho em torno de 48 a 78%, destacando-se *B. cereus* C210, *B. megaterium* C116, *B. subtilis* R14 e *B. cereus* C240, os quais apresentaram, respectivamente, redução de 78, 74, 73 e 71% da doença em campo. Além disso, o período de aplicação do antagonista também foi estudado e foi demonstrada maior eficiência no controle da podridão negra com três aplicações do antagonista, 4 dias antes, simultaneamente e 4 dias após a inoculação do patógeno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados oito isolados de *Bacillus* epifíticos de diversas origens (Tabela 3.1), e nove linhagens da bactéria fitopatogênica *X. campestris* pv. *campestris*, isoladas de repolho em Camocim de São Felix. As linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* foram: C3, C4, C8, C10, C11, C12, C18, S2 e S6.

Tabela 3.1 - *Bacillus* epifíticos e suas origens (ASSIS et al., 1996a).

Isolados de <i>Bacillus</i>	Origem
<i>Bacillus subtilis</i> R14	Repolho
<i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7	Rabanete
<i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> C211	Couve
<i>B. megaterium</i> C116	Couve
<i>Bacillus</i> sp. RAB9	Rabanete
<i>B. cereus</i> C240	Couve
<i>Bacillus</i> sp. C11	Couve
<i>B. cereus</i> C210	Couve

3.2 Meios de Cultura

3.2.1. Meio AN (Ágar-Nutritivo)

O meio AN foi utilizado para a manutenção das culturas de *Bacillus* em tubos inclinados. Sua composição básica é, em g/L:

Extrato de carne	3,0
Peptona de carne	10,0
NaCl	5,0
Ágar	20,0
pH 7,0	

3.2.2. Meio 523 (KADO, HESKETT, 1970)

Para conservação das culturas de *X. campestris* pv. *campestris*, foi usado o meio KADO, que possui a seguinte composição, em g/L:

Sacarose	10,0
Extrato de levedura	4,0
Caseína hidrolisada	8,0
MgSO ₄	0,3
K ₂ HPO ₄	2,0
Ágar	18,0
pH 7,0	

3.2.3. Meio YM (“Yeast-Malt”)

Meio YM foi utilizado para ativar as culturas de *X. campestris* pv. *campestris*. Este meio contém a seguinte composição, em g/L:

Glicose	10,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
pH 7,0	

Para se realizar os testes de atividade antimicrobiana, utilizou-se o meio YM adicionado de 2% (p/v) ágar (YMA).

3.2.4. Meio Ágar Sangue (AS)

Para a realização dos testes de atividade hemolítica dos *Bacillus*, utilizou-se meio AS. A composição desse meio, em g/L, é a seguinte:

Extrato de carne	10,0
Peptona	10,0
NaCl	5,0
Ágar	15,0
pH 7,0	

Além desses componentes, sangue de carneiro desfibrinado foi adicionado ao meio base a uma temperatura em torno de 45° a 50° C, numa proporção de 15% (v/v).

3.2.5. Meio de Fermentação

Foi utilizado um meio com composição básica de sais minerais, baseado no meio otimizado para produção de surfactina de KIM et al. (1997), com algumas modificações quanto a fonte de nitrogênio, manganês e sódio. A concentração dos componentes, em g/L, é a seguinte:

Glicose	40,00
K ₂ HPO ₄	10,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	11,45
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,50
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,73
MnSO ₄ H ₂ O	0,04
Extrato de Levedura	0,50
pH 8,0	

3.3 Procedimento Experimental

3.3.1. Atividade Antagônica de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

A atividade antimicrobiana de *Bacillus* spp. contra *X. campestris* pv. *campestris* foi determinada pelo método de difusão em ágar, utilizando os oito isolados de *Bacillus* e as nove linhagens de *Xanthomonas* citadas no item 3.1. Uma suspensão de cada *X. campestris* pv. *campestris*, cultivada em meio YMA por 24 horas a 30°C, foi preparada com água destilada esterilizada com uma concentração celular equivalente ao padrão número 5 da escala de McFarland (em torno de 10⁹ células/mL). Foram colocados 100 µL dessa suspensão em placas estéreis, medindo 90 mm de diâmetro por 15 mm de altura, e sobre essa suspensão foi

adicionado 10 mL de meio YMA ainda liquefeito, numa proporção de 1% v/v em relação à suspensão.

Uma alíquota de 10 µL de cada cultura de *Bacillus*, crescida em AN por 24 horas a 37°C, foi adicionada a um tubo Eppendorf contendo 200 µL de água destilada estéril. Após a solidificação do meio YMA, 1 µL das suspensões de *Bacillus* foi colocado sobre a placa.

As placas foram incubadas a 37° C por 12 horas, para que o *Bacillus* crescesse antes das *Xanthomonas*. Após esse período, as placas foram deixadas por mais 24 horas a 30° C, temperatura ideal de crescimento da *X. campestris* pv. *campestris*. A leitura dos resultados foi feita medindo-se o diâmetro total do halo de inibição menos o diâmetro da colônia do *Bacillus*. Esse procedimento foi realizado em triplicata, e o resultado, equivalente a média dos três valores obtidos, foi expresso em atividade antimicrobiana (mm).

3.3.2. Atividade Hemolítica de *Bacillus* spp.

Suspensões foram preparadas como descrito no item 3.3.1 com os oito isolados de *Bacillus*. Cada suspensão foi aplicada sobre a superfície do meio ágar sangue numa quantidade de 1 µL. As placas foram incubadas a 30° C e a 37° C e as leituras dos diâmetros dos halos de hemólise foram realizadas em 24, 48 e 72 horas. O teste foi realizado em triplicata, em placas com 90 mm de diâmetro por 15 mm de altura, contendo 10 mL do meio ágar sangue, cada uma. O resultado foi calculado do mesmo modo como o realizado para o teste de atividade antimicrobiana, descrito no item 3.3.1, e foi expresso como atividade hemolítica (mm).

Para verificar se as substâncias produzidas durante o crescimento em ágar sangue também inibiam o crescimento de *Xanthomonas*, foi realizado um outro teste de hemólise utilizando os isolados: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210. Após 72 horas a 37° C, quando foram encontrados os maiores halos de

hemólise, blocos englobando a colônia do *Bacillus* e sua respectiva zona hemolítica, foram cortados com o auxílio de um estilete. A linhagem C10 de *X. campestris* pv. *campestris*, foi escolhida dentre aquelas que foram mais sensíveis nos testes de atividade (item 3.3.1). Uma placa com meio YMA foi preparada com uma suspensão dessa bactéria, como descrito no item 3.3.1 e após solidificação da mesma, os blocos cortados anteriormente foram colocados sobre o meio de cultura. As placas foram incubadas a 30° C por 24 horas.

3.3.3. Fermentação para Produção de Substâncias Bioativas por *Bacillus* spp.

A partir de cultivos de *Bacillus* spp. em meio AN, por 24 horas a 37° C, foram preparadas suspensões com concentração celular equivalente ao padrão número 5 da escala de McFarland (em torno de 10⁹ células/mL), as quais foram inoculadas no meio de fermentação (item 3.2.5), numa proporção de 1% (v/v). As fermentações foram realizadas em frascos Fernbach, contendo 500 mL do meio de fermentação.

Os frascos foram mantidos em mesa agitadora, numa rotação de 150 rpm e sob temperatura de 30° C, por um período de três dias. Durante todo o processo, foram coletadas 10 amostras de 5 mL do mosto fermentado, em intervalos variando entre 6 e 12 horas, para acompanhar o crescimento celular, consumo de glicose e produção de substâncias antimicrobianas.

A seguir são apresentados os métodos utilizados para a quantificação do crescimento celular, consumo de glicose, produção de substâncias antimicrobianas e tensão superficial.

- Crescimento Celular

O crescimento foi acompanhado pela variação da biomassa ao longo do experimento.

Para acompanhar a biomassa, foram utilizados tubos Eppendorfs, livres de umidade

(secos a 80°C por 24 horas) e previamente pesados em balança analítica. Em cada tubo, foi adicionado 1 mL de cada amostra e foram centrifugados a 11.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado para análises posteriores e os sedimentos resultantes foram lavados com água destilada e novamente centrifugados na mesma rotação. Posteriormente, a água sobrenadante foi eliminada e os tubos foram deixados em estufa a 80° C por 24 horas. Após esse período, a pesagem dos mesmos foi realizada em balança analítica, sendo o peso total subtraído do peso inicial do tubo, dando como resultado o valor da massa celular e calculada a concentração em g/L.

- Consumo de Glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase, utilizando-se “kit” da BioMérieux. O açúcar foi dosado no sobrenadante após centrifugação a 11.000 rpm por 15 minutos das amostras coletadas.

- Produção de Substâncias Antimicrobianas

A produção de substâncias bioativas contra *X. campestris* pv. *campestris* foi acompanhada ao longo da fermentação através de testes de atividade antimicrobiana realizados com o líquido fermentado obtido após filtração das células de cada amostra do mosto fermentado. A filtração das células foi realizada em filtros Millex-FG (Millipore), com porosidade 0,22 µm.

A linhagem C10 de *X. campestris* pv. *campestris* foi escolhida como microrganismo teste. Discos de papel previamente autoclavados foram embebidos com 25 µL de líquido fermentado de cada amostra e colocados sobre a placa contendo o meio YMA diluído com a suspensão de *X. campestris* pv. *campestris* C10, como descrito no item 3.3.1.

A leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada após 24 horas de incubação a 30° C. Os resultados foram expressos como atividade antimicrobiana (mm).

- Tensão Superficial

Fermentações foram realizadas nas mesmas condições anteriores, para acompanhar, indiretamente, a produção de biossurfactantes, através da medida da tensão superficial ao longo do crescimento. Com esse objetivo, amostras de 20 mL foram coletadas em intervalos de 24 horas, num período de 3 dias, sendo a amostra inicial, o líquido fermentado obtido logo após a inoculação. Após filtração à vácuo em membranas Millipore com porosidade de 0,22 µm, a tensão superficial do sobrenadante foi medida 2 vezes para cada amostra, utilizando o tensiômetro CSC – Dunoüy Interfacial Tensiometer Cat nº 70545. Os resultados, expostos no item 4.4, são a média aritmética das duas medidas.

A tentativa de isolamento de biossurfactantes, foi realizada apenas na amostra de 72 horas a qual foi adicionado HCL paulatinamente até que a amostra atingisse o pH 2,0, segundo metodologia de COOPER et al. (1981) e KOWALL et al. (1998). Após acidificação, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi separado e o precipitado foi solubilizado com água MilliQ com pH 12,0. O sobrenadante, a água e o precipitado solúvel também foram analisados quanto à tensão superficial.

As Figuras 3.1 e 3.2, mostram fluxogramas de tratamento das amostras para as análises descritas no presente item.

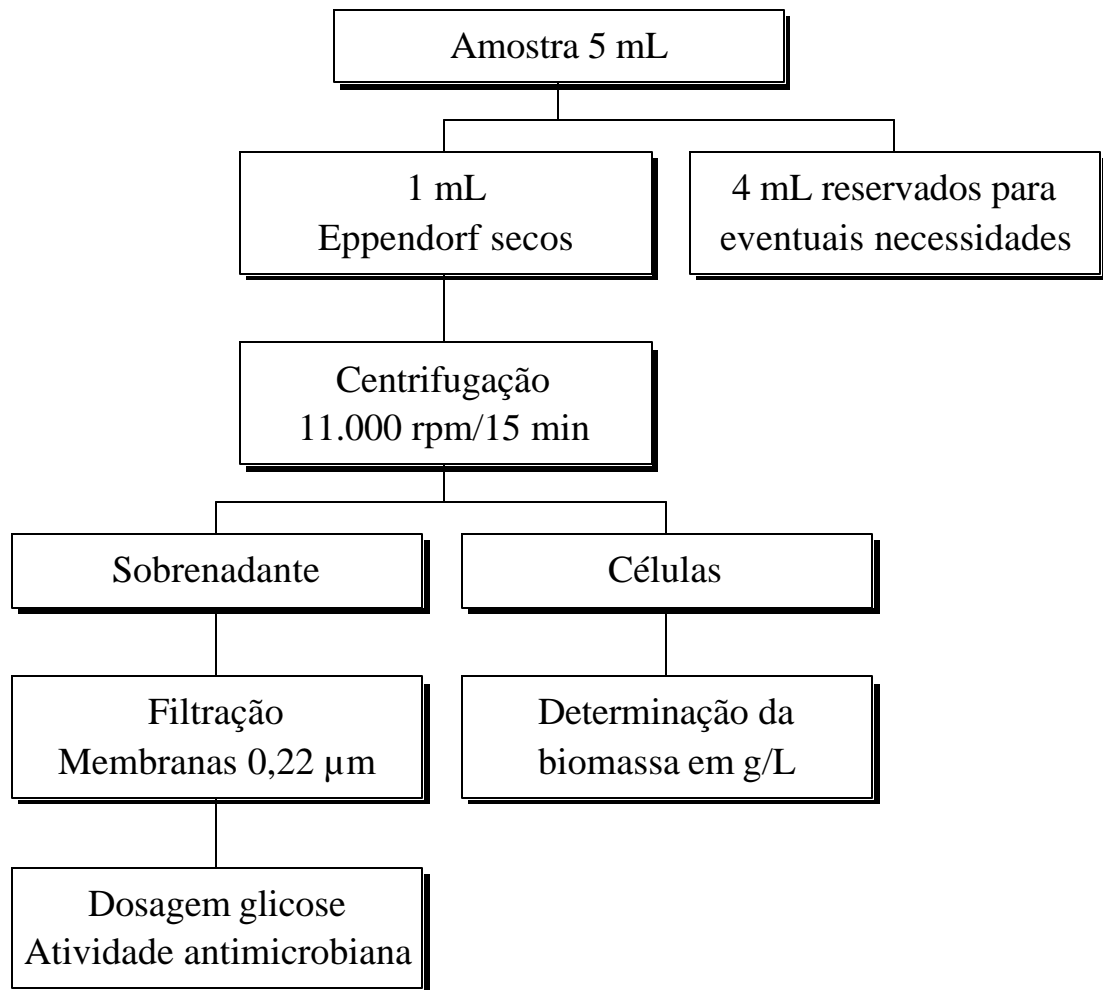


Figura 3.1 – Fluxograma de tratamento das amostras para acompanhamento do crescimento celular, consumo de glicose e atividade antimicrobiana ao longo da fermentação.

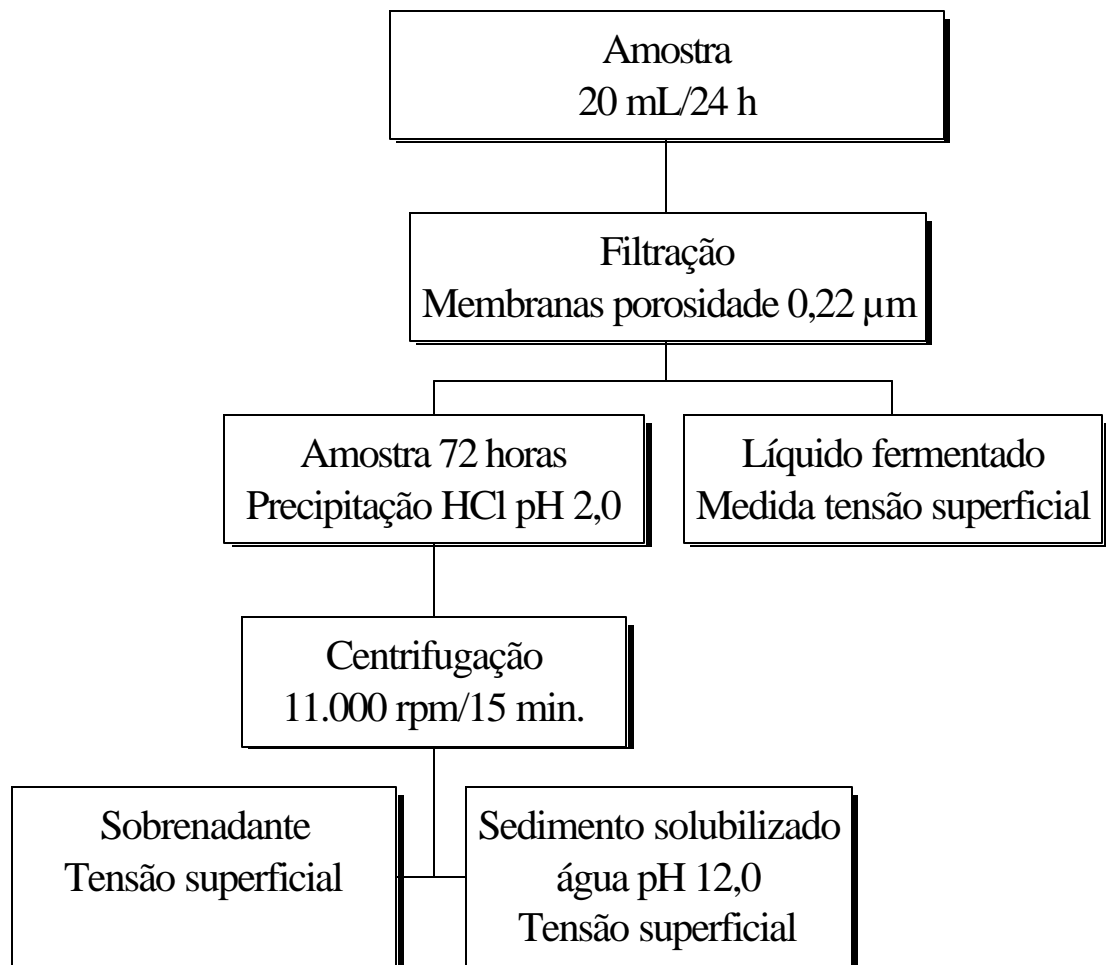


Figura 3.2 – Fluxograma de tratamento das amostras para análise de tensão superficial ao longo da fermentação e isolamento de biossurfactantes.

3.3.4. Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados com delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) realizados com auxílio do software SANEST® (Sistema de Análises Estatísticas, Instituto Agronômico de Campinas – IAC, 1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade Antagônica de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Pesquisas anteriores demonstraram que *Bacillus* spp. epifíticos, isolados de rabanete e couve, apresentam alta eficiência no controle da podridão negra em couve e repolho no campo (ver item 2.4). Os experimentos apresentados neste item tiveram como objetivo a investigação da ocorrência do mecanismo de antibiose de 8 isolados de *Bacillus* spp., os quais foram testados *in vitro* contra 9 linhagens fitopatogênicas de *X. campestris* pv. *campestris*, como descrito no item 3.3.1.

Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana, expostos na Figura 4.1, mostram inibição do crescimento das linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* utilizadas, por quatro dos isolados de *Bacillus* testados: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210. Os demais microrganismos: *Bacillus* sp. RAB9, *B. megaterium* pv. *cerealis* C211, *B. cereus* C240 e *Bacillus* sp. C11, ou não apresentaram nenhuma atividade ou provocaram inibição mínima, com halos menores que 1 mm e por este motivo não foram representados na Figura 4.1.

A análise de variância dos dados demonstrou que houve diferenças significativas entre os antagonistas, entre as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* e entre esses dois fatores (Tabela 4.1).

Em relação à atividade antimicrobiana dos antagonistas contra cada isolado de *Xanthomonas* (Tabela 4.1), foi demonstrado que *Bacillus subtilis* R14 e *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, respectivamente, foram os mais eficientes no antagonismo ao patógeno, sem diferirem entre si, mas diferindo (em relação a algumas linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*) de *B. megaterium* C116 e principalmente de *B. cereus* C210, que pode ser avaliado como o menos eficiente dos quatro antagonistas.

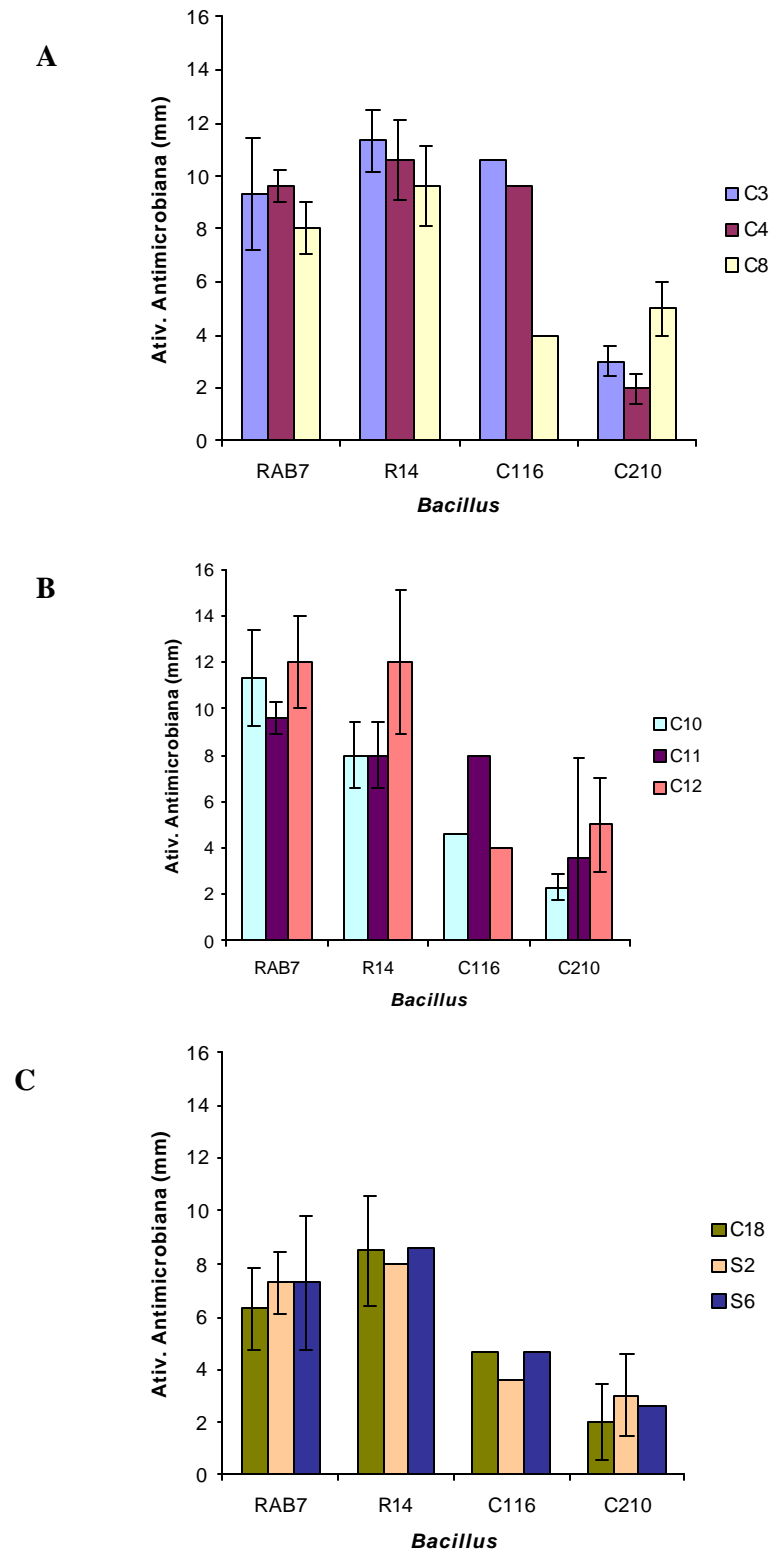


Figura 4.1 –Atividade antimicrobiana de *Bacillus* contra: (A) linhagens C3, C4 e C8; (B) C10, C11 e C12 e (C) C18, S2 e S6 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. A atividade antimicrobiana foi medida pela subtração dos diâmetros do halo de inibição e da colônia do *Bacillus*. Valores são médias de três repetições. RAB7 = *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*; R14 = *B. subtilis*; C116 = *B. megaterium* e C210 = *B. cereus*.

Tabela 4.1 – Atividade antimicrobiana dos isolados de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) avaliada através do halo de inibição medido após 72 horas de inibição.

Isolados de Xcc	Antagonistas			
	RAB 7 ¹	R14	C116	C210
C3	9,3 ab A ²	11,3 ab A	10,7 a A	3,0 a B
C4	9,7 ab A	10,7 ab A	9,7 ab A	2,0 a B
C8	8,0 b AB	9,7 abc A	4,0 d C	5,0 a BC
C10	8,5 ab A	6,0 c AB	4,3 cd B	2,3 a B
C11	9,5 ab A	8,0 bc A	8,0 abc A	3,7 a B
C12	12,0 a A	12,7 a A	4,0 d B	5,0 a B
C18	6,3 b A	8,5 bc A	6,0 bcd A	2,0 a B
S2	7,3 b AB	8,0 bc A	3,7 d BC	3,0 a C
S6	7,3 b A	8,7 bc A	3,0 d B	2,3 a B

¹RAB7= *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*; R14= *Bacillus subtilis*; C116= *Bacillus megaterium* e C210= *Bacillus cereus*.

²Média de 3 repetições. Médias seguidas de mesma letra minúscula no sentido da coluna e maiúscula no sentido da linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

A sensibilidade dos isolados da bactéria fitopatogênica em relação a cada um dos antagonistas estudados também foi analisada, sendo encontrada grande variabilidade entre as linhagens. Pode-se observar, por esse estudo, que a linhagem C12 foi mais sensível aos antagonistas RAB7 e R14, sem diferença significativa entre os isolados C4, C11, C3 e C10, no primeiro, e entre C3, C4 e C8, no segundo caso. No entanto, essa mesma bactéria, *X. campestris* pv. *campestris* C12, não foi tão sensível à ação do *Bacillus* C116, sendo a linhagem C3 a mais inibida por este antagonista, não diferindo entre C4 e C11. Em relação ao *B. cereus* C210, este foi o que apresentou menor atividade antimicrobiana contra todas as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*, não havendo diferença significativa entre os nove isolados desta bactéria.

Estas interações significativas demonstram que existe especificidade entre os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* e dos antagonistas, ou seja, nem todos os antagonistas controlam os isolados com a mesma eficiência, e nem todas as linhagens de *X. campestris* pv.

campestris têm a mesma sensibilidade a esses antagonistas. Este fato pode ser explicado pela variabilidade genética dos dois grupos de microrganismos.

LUNA et al.(2000) realizaram testes *in vitro* com as mesmas linhagens de *Bacillus* utilizadas no presente estudo, contra *X. campestris* pv. *campestris* LFR-3, e mostraram que as linhagens RAB7, R14, C210 e C116 também apresentam atividade inibitória contra LFR-3. No entanto, essa mesma atividade não foi observada no caldo fermentado obtido do crescimento desses *Bacillus* em meios de cultura à base de melão, como fonte de carbono.

Vários autores já mencionaram que muitas bactérias, apesar de apresentarem alta atividade antimicrobiana *in vitro* contra fitopatógenos, apresentam pouco ou nenhum controle da doença na planta, ressaltando a freqüente falta de correlação dos estudos *in vitro* e *in vivo* (KOMMEDAHL & WINDELS, 1976; LANG & KOMMEDAHL, 1976; PAPAVIDAS & LEWIS, 1983, *apud*. FRAVEL, 1988). No entanto, este não é o caso dos antagonistas estudados, pois os testes de atividade antimicrobiana de *Bacillus* contra *X. campestris* pv. *campestris* comprovaram o que já havia sido relatado anteriormente em casa de vegetação por ASSIS et al. (1996a), onde foram testadas 13 linhagens de *Bacillus*, dentre elas, R14 e C210, as quais controlaram totalmente a podridão negra causada por 3 linhagens desse fitopatógeno em couve. Estudos semelhantes foram feitos em repolho por ASSIS et al. (1997), os quais também comprovaram a boa aplicabilidade de *Bacillus* R14, C210 e C116 no biocontrole da podridão negra em campo.

4.2 Atividade Hemolítica de *Bacillus* spp.

Como discutido no item 2.3, os lipopeptídeos apresentam um amplo espectro de atividades, incluindo atividade hemolítica, estando essas propriedades relacionadas com as características anfipáticas de sua estrutura química e são constantemente utilizadas para seleção de microrganismos produtores dessas substâncias. Dessa forma, os testes de hemólise foram realizados com o objetivo de se observar a produção de lipopeptídeos pelas linhagens de *Bacillus* em estudo e de verificar a possível importância dessas substâncias em relação à atividade antimicrobiana, discutida no item 4.1.

Os resultados dos ensaios para atividade hemolítica dos *Bacillus*, expostos nas Figuras 4.2 e 4.3, mostram que dentre os oito isolados, os mesmos que apresentaram atividade antimicrobiana nos testes anteriores, *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, também produziram halos de hemólise em meio ágar sangue. Esses resultados foram analisados pelo teste de Tukey, que avaliou as interações entre as temperaturas utilizadas, entre os oito isolados de *Bacillus* e entre esses dois fatores, havendo diferenças significativas nos três casos (Tabela 4.2).

A atividade hemolítica avaliada à temperatura de 30° C, destacou *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* C116 os quais apresentaram atividade hemolítica após 72 horas de incubação, não havendo diferença significativa entre eles. Os demais antagonistas não apresentaram hemólise nesta temperatura. No entanto, a temperatura de 37° C, se mostrou mais apropriada para esse estudo, pois nesse caso, quatro isolados apresentaram resultados significantes: *B. megaterium* C116, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14 e *B. cereus* C210, com halos maiores que os encontrados no estudo anterior, sendo que os dois primeiros diferiram significativamente dos dois últimos, e os quatro diferiram dos demais.

Tabela 4.2 – Atividade hemolítica de *Bacillus* spp. em diferentes temperaturas.

Temperatura	Antagonistas							
	RAB 7 ¹	R14	C116	C210	C211	C240	C11	RAB9
30° C	2,7 bA ²	1,7 bA	2,7 bA	0,0 bB	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	0,0 a B
37° C	7,7 aA	3,7 aB	8,3 aA	3,0 aB	0,0 aC	0,0 aC	0,0 aC	0,0 a C

¹RAB7= *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*; R14= *Bacillus subtilis*; C116= *Bacillus megaterium*, C210= *Bacillus cereus*, C211= *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*, C240= *Bacillus cereus*, C11= *Bacillus* sp. e RAB9= *Bacillus* sp.

²Média de 3 repetições. Médias seguidas de mesma letra minúscula no sentido da coluna e maiúscula no sentido da linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

³Os dados foram transformados segundo a equação: RAIZ (x + 0,5), para comparação de médias.

Note-se que o isolado C210 não demonstrou atividade hemolítica a 30° C e sim a 37° C, diferindo de *B. megaterium* pv. *cerealis* C211, *B. cereus* C240, *Bacillus* sp. C11 e *Bacillus* sp. RAB9, os quais não apresentaram essa propriedade em nenhuma das temperaturas.

Comparando-se os resultados obtidos nos testes de hemólise com os de atividade antimicrobiana (Figura 4.4), observa-se que existe uma relação entre a produção de lipopeptídeos e a inibição do crescimento das bactérias fitopatogênicas, pois os mesmos microrganismos que produziram hemólise, RAB7, R14 e C116, na Figura 4.4 A, e C210, na Figura 4.4 B, também apresentaram atividade antimicrobiana contra as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*. Neste estudo, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 está entre os antagonistas que apresentaram maior atividade hemolítica e antimicrobiana. Em relação aos isolados R14 e C116, o primeiro se mostrou o melhor antagonista dentre todos nos testes de atividade antimicrobiana, no entanto, apresentou menor atividade hemolítica do que o isolado C116, que demonstrou os maiores halos de hemólise dentre os oito antagonistas (Figura 4.4). O teste de hemólise avalia indiretamente a produção de biossurfactantes pelos microrganismos, o

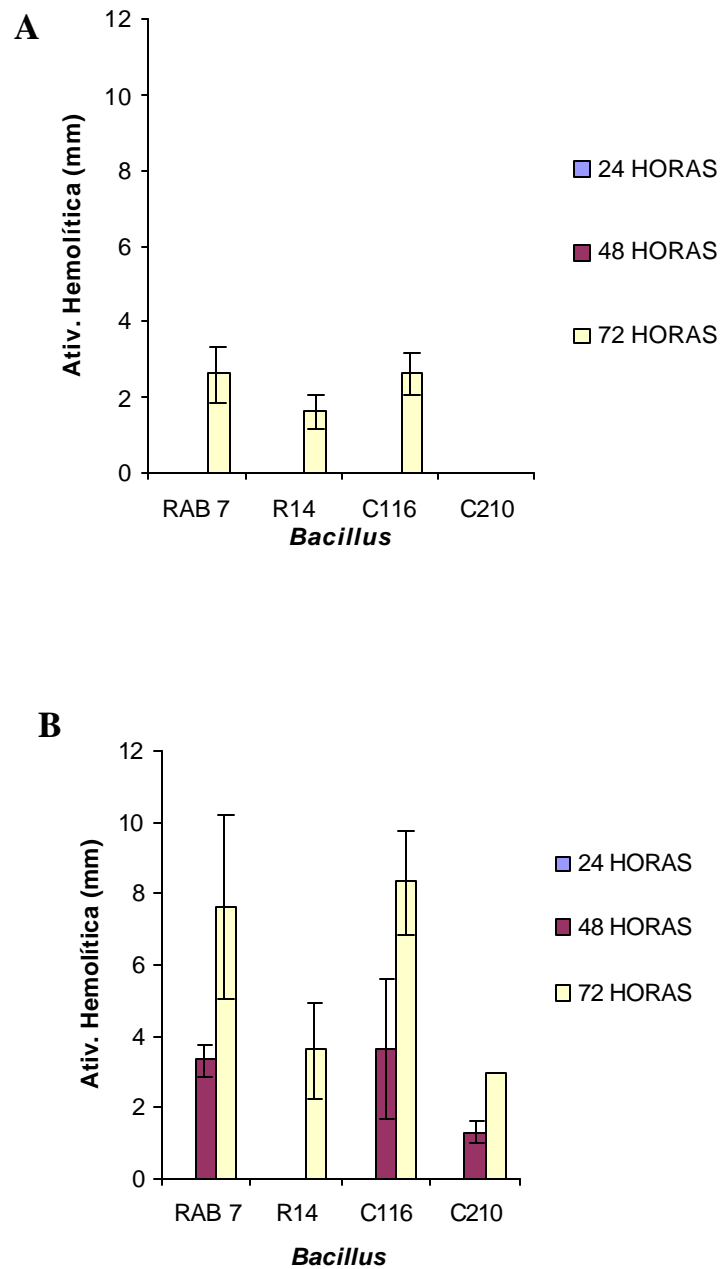


Figura 4.2 - Atividade hemolítica de *Bacillus* spp, com leituras a 24, 48 e 72 horas, obtidas em temperatura de: (A) 30° C e (B) 37° C. A atividade hemolítica foi medida pela subtração dos diâmetros do halo de inibição e da colônia do *Bacillus*. Valores são médias de três repetições. RAB7 = *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*; R14 = *B. subtilis*; C116 = *B. megaterium* e C210 = *B. cereus*.

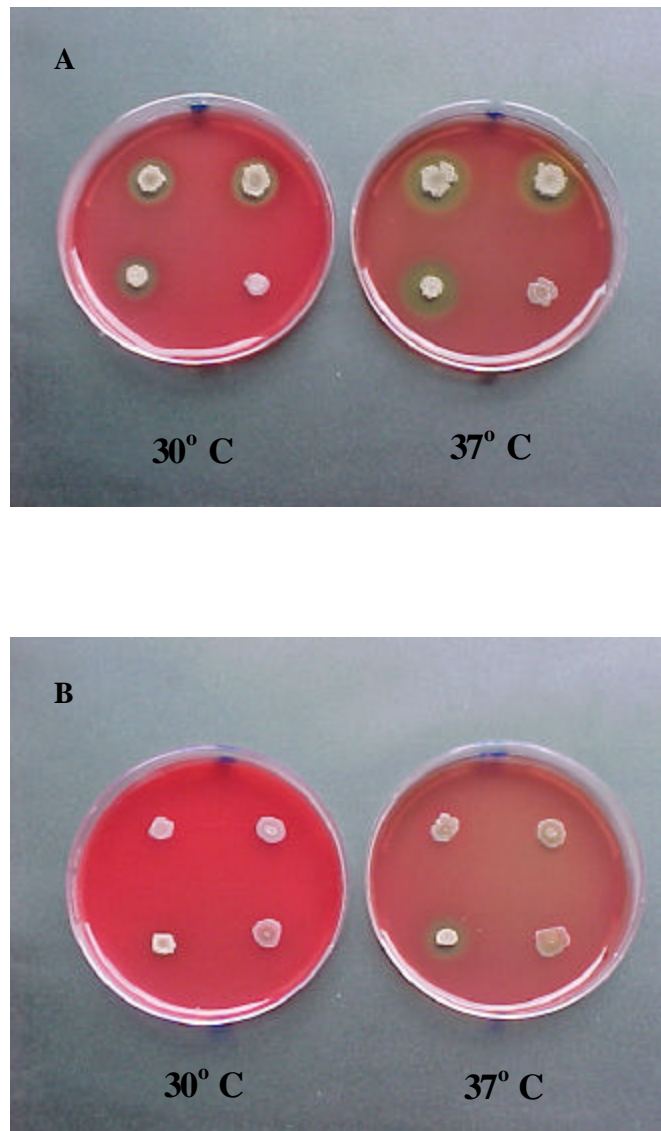


Figura 4.3 - Atividade hemolítica obtida após 72 horas em temperatura de 30° C e 37° C por *Bacillus* spp., no sentido horário a partir do quadrante superior esquerdo: (A) *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7; *B. subtilis* R14; *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* C211 e *B. megaterium* C116 e (B) *B. cereus* C240; *Bacillus* sp. RAB9; *Bacillus* sp. C11 e *B. cereus* C210.

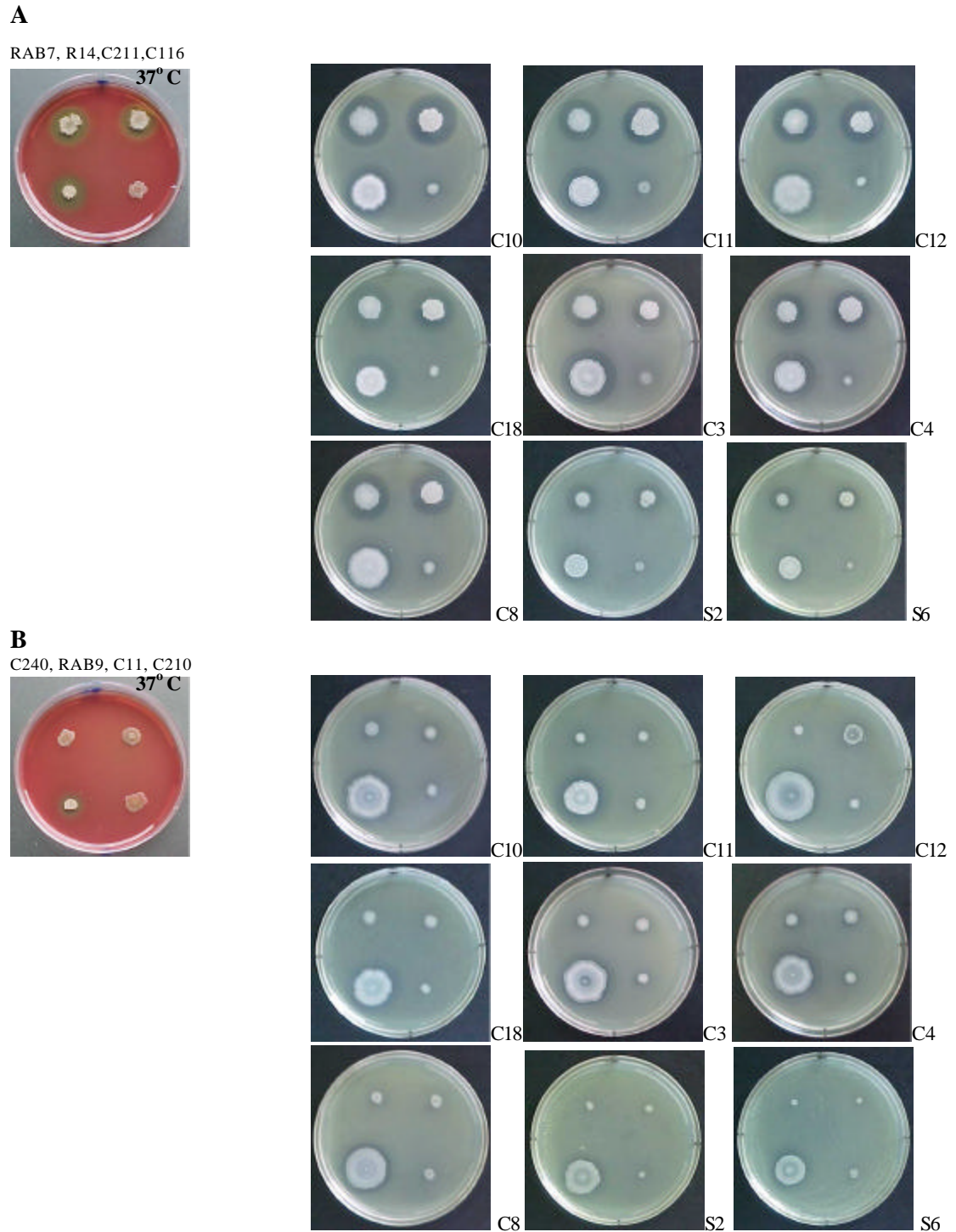


Figura 4.4 – Relação entre atividade hemolítica, após 72 horas a 37° C (esquerda) e antimicrobiana (direita) de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. No sentido horário, a partir do quadrante superior esquerdo: (A) *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7; *B. subtilis* R14; *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* C211 e *B. megaterium* C116 e (B) *B. cereus* C240; *Bacillus* sp. RAB9; *Bacillus* sp. C11 e *B. cereus* C210.

que não significa que estas substâncias possuam atividade antimicrobiana na mesma intensidade que hemolítica. Este fato pode ser uma possível explicação para os comportamentos dos isolados R14 e C116 nos experimentos.

Adicionalmente, *B. cereus* C210, o qual apresentou resultados menos significativos nos testes de antagonismo em relação aos demais *Bacillus*, também demonstrou menor atividade hemolítica quando comparado com os outros microrganismos testados.

Experimento adicional foi realizado com os blocos de gelose obtidos a partir do teste de hemólise dos isolados: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, como descrito no item 3.3.2. O resultado obtido, ilustrado na Figura 4.5, mostra que as substâncias produzidas pelos isolados, presentes nos halos de hemólise, possuem atividade antimicrobiana contra *X. campestris* pv. *campestris*.

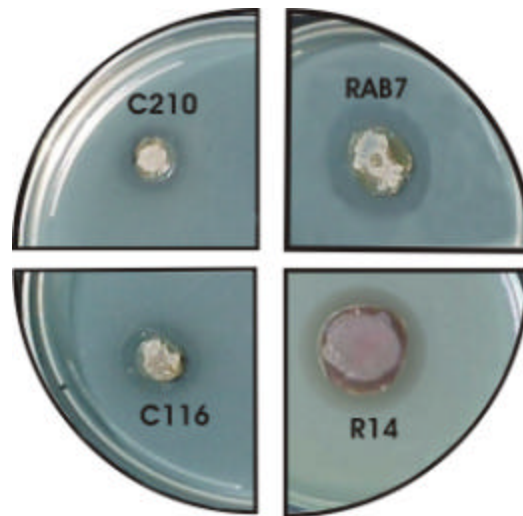


Figura 4.5 – Atividade antimicrobiana contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* dos blocos de gelose obtidos a partir do crescimento de *Bacillus* em meio ágar sangue a 37° C após 72 horas. Os blocos de gelose foram recortados, incluindo a colônia do microrganismo e seu respectivo halo de hemólise. RAB7 = *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7; R14= *B. subtilis* R14; C116 = *B. megaterium* C116 e C210 = *B. cereus* C210.

4.3 Fermentação para Produção de Substâncias Bioativas por *Bacillus* spp.

A partir dos resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana, foram selecionados três isolados de *Bacillus* para realização dos estudos fermentativos: *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* C116, os quais apresentaram melhor atividade contra as linhagens da bactéria fitopatogênica.

4.3.1. Curvas de Crescimento e Formação de Produtos Bioativos

Nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, estão expostos os gráficos com a variação da biomassa, consumo de glicose e produção de substância antimicrobiana durante o crescimento de *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* C116, respectivamente. *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. subtilis* R14 apresentaram uma fase de crescimento mais longa, em torno de 54 horas, em relação ao *B. megaterium* C116, que apresentou um crescimento brusco a partir das 12 horas e iniciou a fase estacionária antes dos demais microrganismos, após 30 horas. A produção final de biomassa foi também semelhante para *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. subtilis* R14, atingindo valores em torno de 2,5 g/L. *B. megaterium* C116 apresentou maior rendimento em biomassa, com valor final acima de 3,0 g/L.

Semelhantemente ao aumento da biomassa, o consumo de glicose ocorreu mais rapidamente durante o crescimento de *B. megaterium* C116. Para *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. subtilis* R14, os valores de glicose se aproximaram de zero após 48 horas, enquanto que para *B. megaterium* C116 isto ocorreu após 36 horas.

A atividade antimicrobiana contra *X. campestris* pv. *campestris* C10 foi observada durante a fase de crescimento de *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14 e *B.*

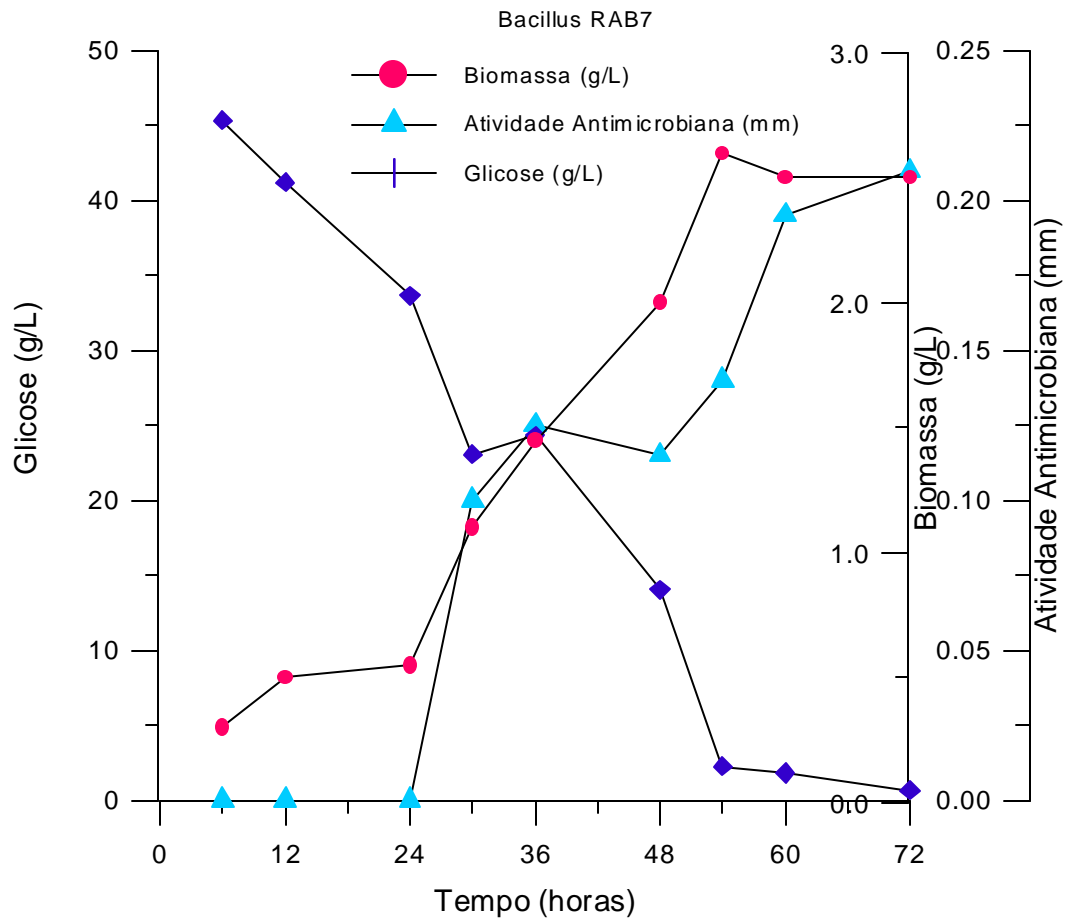


Figura 4.6 - Curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produto bioativo contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* C10, apresentadas por *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7.

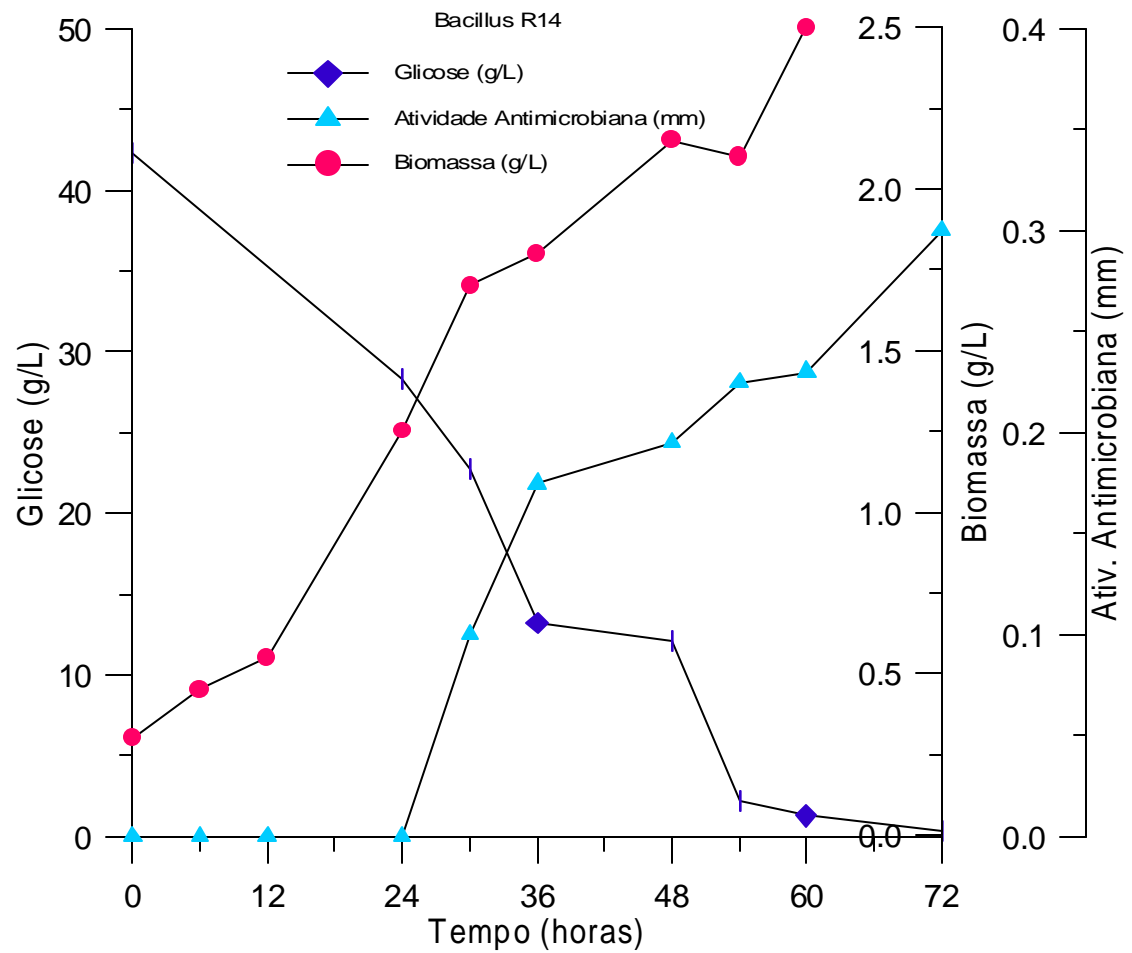


Figura 4.7 - Curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produto bioativo contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* C10, apresentadas por *Bacillus subtilis* R14.

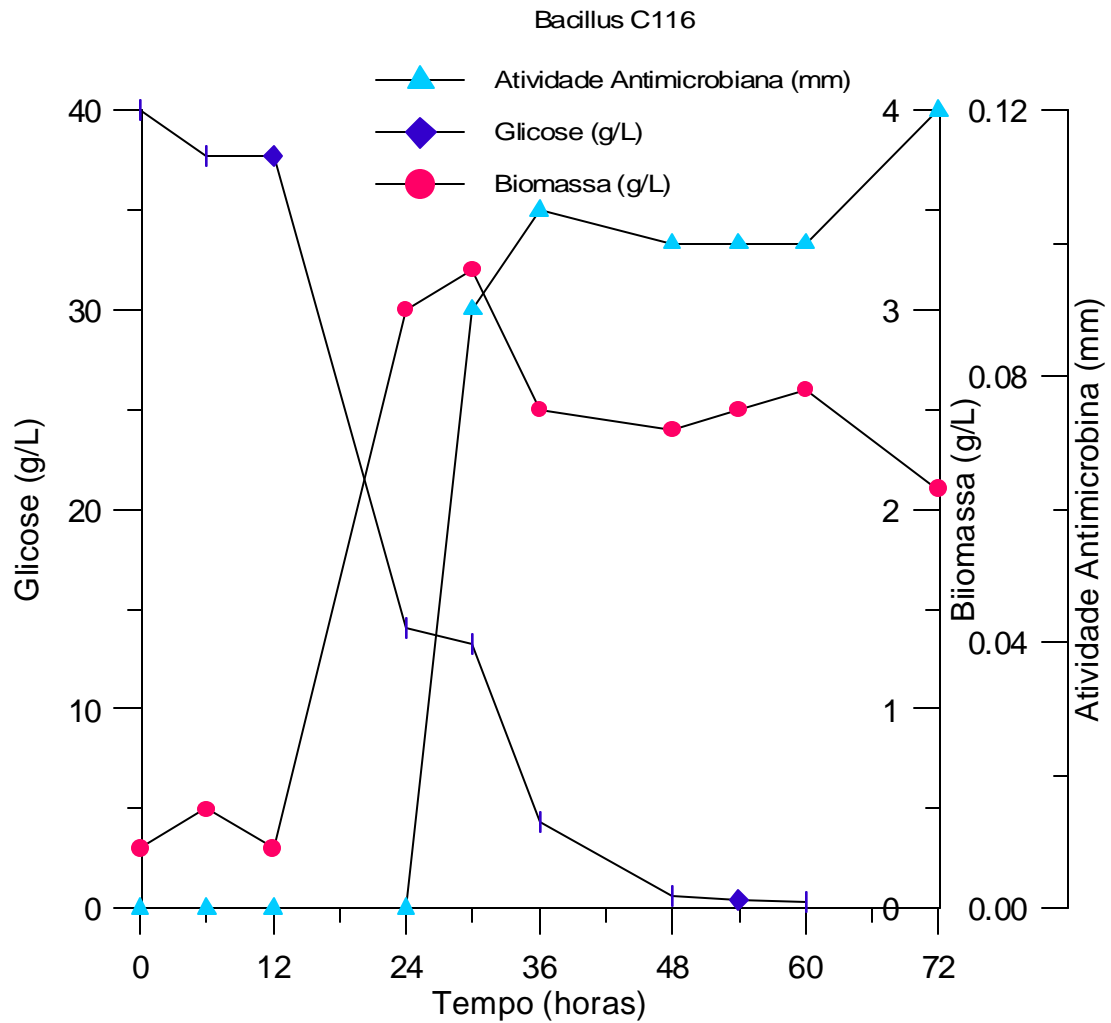


Figura 4.8 - Curvas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de produto bioativo contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* C10, apresentadas por *Bacillus megaterium* C116.

megaterium C116, aumentando progressivamente após 24 horas de fermentação, o que indica que a produção de substâncias bioativas está associada ao crescimento desses microrganismos.

Na Figura 4.9, é possível se observar que a atividade antimicrobiana do líquido fermentado desses microrganismos foi semelhante àquela apresentada nos testes de antagonismo em meio sólido, pois *Bacillus subtilis* R14 e *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7, apresentaram maiores halos de inibição ao longo da curva de crescimento quando comparados com os resultados do líquido fermentado de *B. megaterium* C116, atingindo valores de 0,21 mm, 0,30 mm e 0,12 mm, respectivamente, após 72 horas de crescimento.

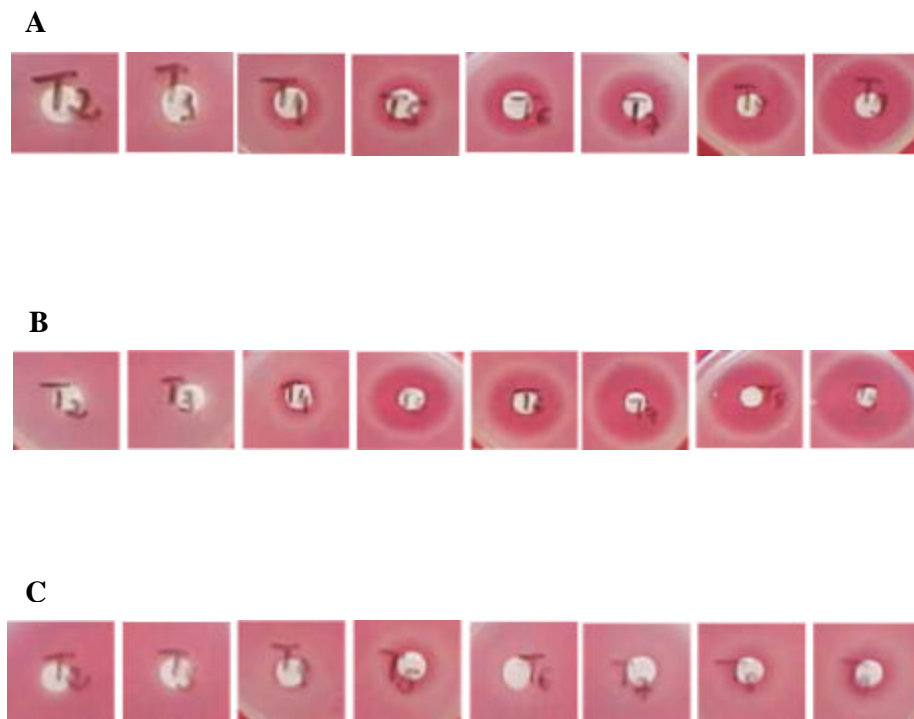


Figura 4.9 - Atividade antimicrobiana do líquido fermentado de (A) *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7, (B) *Bacillus subtilis* R14 e (C) *Bacillus megaterium* C116, ao longo da curva de crescimento, da esquerda para a direita, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60 e 72 horas.

4.3.2. Produção de Substâncias Tensoativas

Fermentações foram realizadas nas mesmas condições anteriores, para acompanhar a variação de tensão superficial no líquido ao longo da curva de crescimento, que representa, indiretamente, a produção de biossurfactantes. Na Tabela 4.3, pode-se observar um comportamento semelhante para os três *Bacillus* utilizados, sendo que a tensão superficial no líquido fermentado de *B. megaterium* C116, que apresentou crescimento mais rápido nos estudos de fermentação, discutidos no item 4.3.1, diminuiu mais rapidamente em relação aos demais antagonistas estudados. Entretanto, de uma forma geral, a diminuição da tensão superficial ocorreu analogamente nos três *Bacillus*, durante o crescimento, com valores de 41,0 a 43,0 mN/m inicialmente, chegando em torno de 35,0 a 37,0 mN/m ao final dos 3 dias de fermentação.

Como descrito no item 3.3.3, tentou-se isolar substâncias tensoativas do líquido fermentado através de precipitação com ácido. Na Tabela 4.4, observa-se que após a precipitação do líquido fermentado, o sobrenadante resultante apresentou tensão superficial maior, indicando que substâncias tensoativas foram removidas através da precipitação. Esse precipitado, por sua vez, foi solubilizado em água (pH 12,0) e baixou a tensão superficial desta, confirmando a presença de biossurfactantes no precipitado.

Biossurfactantes produzidos durante o crescimento de microrganismos em meio líquido tendem a ser concentrar na espuma, tendo pouca atividade no meio (COOPER et al., 1981). Este fato pode justificar a tensão superficial não ter sido tão baixa quanto os valores relatados na literatura, que chegam abaixo de 30 mN/m como nos estudos realizados por KIM et al. (1997). Pois no presente estudo não houve nenhum processo especial para extração da espuma.

Tabela 4.3 – Tensão superficial medida no líquido fermentado, após inoculação, a 24, 48 e 72 horas de fermentação.

Isolados	Tensão Superficial (mN/m)			
	Tempo 0 ¹	24 horas	48 horas	72 horas
<i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7	42,8	40,75	36,6	35,45
<i>Bacillus subtilis</i> R14	43,5	42,45	35,3	37,65
<i>B. megaterium</i> C116	41,5	30,0	37,85	35,5

¹Tempo 0 = amostra obtida após inoculação.

Tabela 4.4 – Tensão superficial medida no líquido fermentado, precipitado solubilizado em água e sobrenadante a 72 horas de crescimento.

Isolados	Tensão Superficial (mN/m)		
	Líquido fermentado	Sobrenadante	Precipitado solubilizado em água ¹
<i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7	35,45	40,35	41,95
<i>Bacillus subtilis</i> R14	35,3	38,2	45,45
<i>B. megaterium</i> C116	35,5	41,0	44,13

¹A água utilizada para solubilizar o precipitado teve seu pH aferido para 12,0 e apresentou tensão superficial de 65,9 mN/m.

KIM, et al. (1997) extraíram biossurfactante da espuma que saía em excesso do fermentador e afirmaram que a produção dessa substância pode ser afetada pela aeração e concentração de O₂ dissolvido, sendo, portanto, de suma importância o controle desses parâmetros para uma maior produção de biossurfactantes. Além disso, COOPER et al. (1981) afirmaram que a remoção da espuma estimula a produção desses compostos por *Bacillus* spp.

Nas Figuras 4.10, 4.11 e 4.12, pode-se observar que a diminuição da tensão superficial e o aumento da atividade antimicrobiana ocorre durante a fase de crescimento dos três

isolados. KIM et al. (1997) estudaram a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* C9, utilizando o mesmo meio do presente estudo, em biorreator, a 30° C e 300 rpm, e observaram também uma produção de biossurfactantes associada ao crescimento celular. Da mesma forma, OHNO et al. (1995) concluíram que a produção dos lipopeptídeos iturina A e surfactina ocorre associada ao crescimento de *B. subtilis* RB14, e FOX & BALA (2000) demonstraram que a diminuição da tensão superficial por *B. subtilis* ATCC 21332 ocorre entre o meio e o final da fase exponencial de crescimento, independente do meio de cultura utilizado.

Os resultados obtidos no presente estudo, onde a produção de substâncias antimicrobianas e surfactantes ocorre durante a fase de crescimento de *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *Bacillus subtilis* R14 e *B. megaterium* C116, indicam que lipopeptídeos podem ter um papel importante no antagonismo contra *X. campestris* pv. *campestris*. Testes de atividade foram realizados com surfactina da SIGMA, utilizando-se discos de papel contendo 25 µL de solução de 1 mg/L, para verificar a ação do biossurfactante contra *X. campestris* pv. *campestris* C10, em meio YMA. Embora o resultado tenha sido negativo, a literatura mostra que a presença de um surfactante potente, como a surfactina, pode intensificar a atividade antimicrobiana de outros lipopeptídeos com menor atividade tensoativa.

HIRAOKA et al. (1992), estudaram a atividade da surfactina e iturina, bem como a combinação desses dois lipopeptídeos contra o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causador da murcha-de-fusário do tomateiro e observaram que a surfactina sozinha não apresenta atividade antimicrobiana. Entretanto, a combinação das duas substâncias produz maior inibição do crescimento do fitopatógeno quando comparada à ação apenas da iturina. Segundo OHNO et al. (1995), a maior atividade, relacionada à produção simultânea de surfactina e iturina, está associada à atividade citolítica da primeira, que enfraquece a membrana celular, permitindo o ataque da segunda. Dessa forma, *B. subtilis* RB14, produtor de surfactina e iturina, inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, bem como

de outros fungos fitopatogênicos, mais significativamente que o isolado *B. subtilis* NB22, o qual produz apenas iturina A (HIRAOKA, et al., 1992).

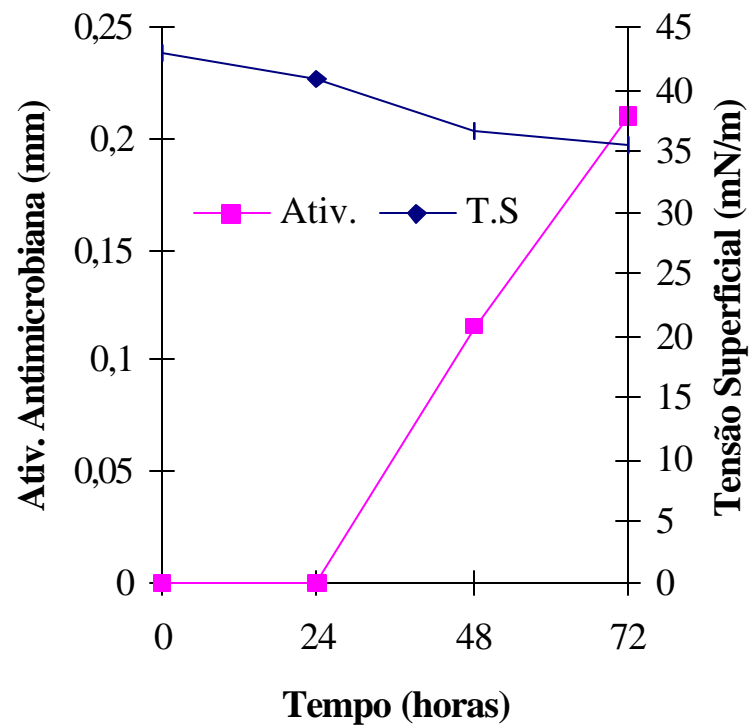


Figura 4.10– Atividade antimicrobiana e tensão superficial do líquido fermentado de *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7.

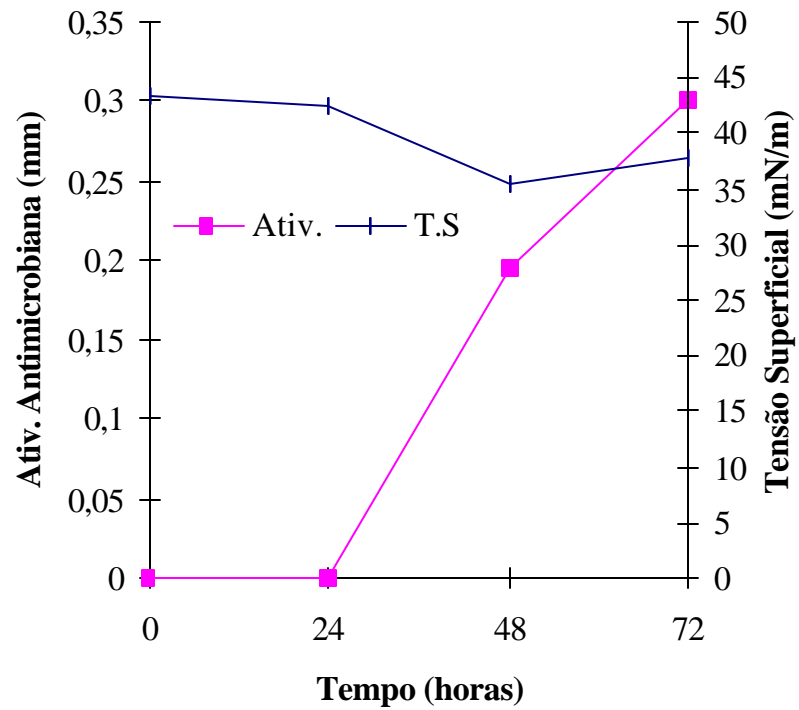


Figura 4.11 – Atividade antimicrobiana e tensão superficial do líquido fermentado de *Bacillus subtilis* R14.

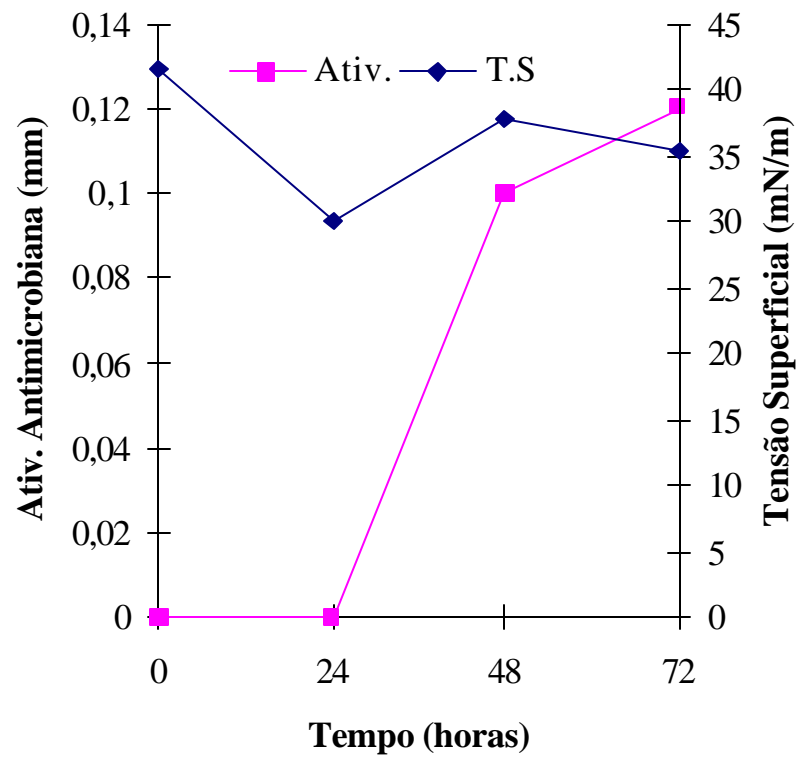


Figura 4.12 – Atividade antimicrobiana e tensão superficial do líquido fermentado *Bacillus megaterium* C116.

5. CONCLUSÕES

1. Dos oito isolados de *Bacillus* estudados, quatro produziram substâncias capazes de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: *Bacillus subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, sendo os dois primeiros os mais eficientes quanto à atividade antimicrobiana.
2. Esses mesmos isolados também produziram substâncias hemolíticas em meio ágar sangue, enquanto que os demais não apresentaram nenhuma zona de hemólise nos testes realizados. Dentre estes microrganismos, *B. megaterium* C116 se destacou quanto à atividade hemolítica, seguido de *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *Bacillus subtilis* R14 e *B. cereus* C210.
3. A correlação dos testes de atividade antimicrobiana com os de hemólise sugere que os lipopeptídeos têm um papel no antagonismo apresentado por esses microrganismos.
4. Nos estudos fermentativos, foi observado que a atividade antimicrobiana do líquido fermentado desses microrganismos foi semelhante àquela apresentada nos testes de antagonismo em meio sólido, pois *Bacillus subtilis* R14 e *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7, apresentaram maiores halos de inibição ao longo da curva de crescimento quando comparados com os resultados do líquido fermentado de *B. megaterium* C116.
5. A diminuição da tensão superficial, que indica, indiretamente, a produção de biossurfactantes, acompanhou o aumento da atividade antimicrobiana no líquido fermentado nos três *Bacillus* estudados, reforçando o papel dos lipopeptídeos no antagonismo de *Bacillus* spp. contra *X. campestris* pv. *campestris*.

6. A surfactina não apresentou atividade contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. No entanto, não se pode dizer que este lipopeptídeo não estivesse sendo produzido pelos antagonistas, pois a surfactina podia estar agindo em conjunto com outra substância, fortalecendo a ação antimicrobiana desta.

6. SUGESTÕES

1. Realizar estudos mais aprofundados com relação ao isolamento das substâncias bioativas obtidas no presente trabalho, bem como, a identificação das mesmas, com o objetivo de verificar que substâncias atuam na atividade antimicrobiana e na queda da tensão superficial.
2. Realizar estudos em campo com o caldo fermentado com e sem células, antes e após a precipitação com ácido visando o controle da podridão negra em crucíferas e o esclarecimento do mecanismo de ação dos antagonistas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-EL-DAHAB, M.K., EL-GOORANI, M.A. Antagonistic Effect of a *Bacillus subtilis* Strain upon *Erwinia amylovora*. **Phytopathological Notes**, v. 54, p. 1285-1286, 1964.

AHIMOU, F., JACQUES, P., DELEU, M. Surfactin and Iturin A Effects on *Bacillus subtilis* Surface Hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 27, p. 749-754, 2000.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996.

ASSIS, S. M. P., et al. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Cabbage Phylloplane in the Field. In: FOURTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 1997a, Japan, **Proceedings Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Present Status and Future Prospects**. Japan: OECD, 1997, p.345-348.

ASSIS, S. M. P., et al. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Kale with *Bacillus* spp. And Endophytic Bacteria. In: WENHUA, T. et al. (Eds.) **Advances in Biological Control of Plant Diseases**. Beijing, 1996a, p. 374-379.

ASSIS, S. M. P. et al. Survival and Redistribution of *Bacillus* spp., Potential Biocontrol Agents of Black Rot, on Kale Phylloplane. In: WENHUA, T. et al (Eds.) **Advances in Biological Control of Plant Diseases**. Beijing, 1996b, p. 347-353.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for Biological Control of Plant Diseases. In: RECHCIGL, N. A., RECHCIGL, J. E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis Publishers, 1997, p. 95-109.

BAKER, C. J.; STAVELY, J. R. Biocontrol of Bean Rust by *Bacillus subtilis* Under Field Conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 9, p. 770-772, 1985.

BAPAT, S.; SHAH, A. K. Biological Control of Fusarial Wilt of Pigeon Pea by *Bacillus subtilis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 46, p. 125-132, 2000.

CHANWAY, C. P.; RADLEY, R. A.; HOLL, F. B. Inoculation of Conifer Seed with Plant Growth Promoting *Bacillus* Strains Causes Increased Seedling Emergence and Biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v. 23, n. 6, p. 575-580, 1991.

CHANWAY, C. P., et al. Endophytic Colonization and Field Responses of Hybrid Spruce Seedlings after Inoculation with Plant Growth-promoting Rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, n. 133, p. 81-88, 2000.

- COOPER, D. G., et al. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.
- COSTA, V. S. O., MARIANO, R. L. R., MICHEREFF, S. J. Variabilidade de Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, 2001.
- DESAI, J. D., DESAI, A. J. Production of Biosurfactants. In: NAIM, Kosaric. **Biosurfactants. Production, Properties, Applications**. Marcel Dekker, INC: New York, 1993. cap. 2, p 65-97.
- DESAI, J. D.; BANAT, I.M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, USA, v. 61, n. 1, p. 47-64, mar. 1997.
- FIDDMAN, P. J.; ROSSALL, S. Effect of Substrate on the Production of Antifungal Volatiles from *Bacillus subtilis*. **J. Applied Bacteriol.**, v. 76, p. 395-405, 1994.
- FRAVEL, D. R. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 26, p. 75-91, 1988.
- FOX, S., BALA, G. A. Production of Surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.
- GRAU, A. et al. Aggregational Behavior of Aqueous Dispersions of the Antifungal Lipopeptide Iturin A. **Peptides**, v. 22, p. 1-5, 2001.
- HIRAOKA, H. et al. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, Coproducer of Peptide Antibiotics Iturin A and Surfactin. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 38, p. 635-640, 1992.
- KADO, E. I., HESKETT, M. G. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology Worcester**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KAMEDA, Y. et al Antitumor Activity of *Bacillus natto*. Isolation and Characterization of Surfactin in the Culture Medium of *Bacillus natto* KMD 2311. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 22, n. 4, p. 938-944, 1974.
- KIM, H. et al. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.
- KIM, K. et al Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A₂. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 975-985, 1998.
- KLOEPPER, J. W. Current Status and Future Trends in Biocontrol Research and Development in the U.S. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CLEAN AGRICULTURE, 1997, Japão. **Anais Simpósio**. Japão, 1997, p. 49-52.

- KOWALL, M. et al. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 204, p. 1-8, 1998.
- LAZZARETTI, E., BETTIOL, W. Tratamento de sementes de Arroz, Trigo, feijão e Soja com um Produto Formulado à Base de Células e de Metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 54, n. 1 e 2, p. 89-96, 1997.
- LEIFERT, C., et al Antibiotic Production and Biocontrol Activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **J. Applied Bacteriol.**, v. 78, p. 97-108, 1995.
- LIN, S-C. Biosurfactans: Recent Advances. **J. Chem. Tech. Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.
- LUNA, C. L.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO MAIOR, A. M. Produção de *Bacillus subtilis* R14 para Utilização em Controle Biológico da Podridão Negra das Crucíferas. In: XIII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 2000, Teresópolis. **Anais Simpósio**. São Paulo, 2000. CD-ROM.
- LUZ, W. C. Rhizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e de Bioproteção. **RAPP**, v. 4, p. 1-49, 1996.
- MARAHIEL, M. A.; NAKANO, M. M.; ZUBER, P. Regulation of Peptide Antibiotic Production in *Bacillus*. **Mol. Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 631-636, 1993.
- MARIANO, R. L. R., et al Biocontrole de Doenças de Plantas. In: SEMANA DE FITOSSANIDADE, 2000, Recife. **Livro de Palestra e Mini Cursos - Desafios no Manejo Integrado de Pragas e Doenças**. Recife: UFPE, 2000. p 78-111.
- MARINGONI, A.C. Doenças das Crucíferas. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. Editora Agronômica Ceres Ltda: São Paulo, 1997. v. 2, cap. 28, p. 315-316.
- MAGET-DANA, R. et al. Interfacial Properties of the Antifungal Iturins on Various Electrolyte Solutions. **Journal of Colloid and Interfacial Science**, v. 149, n.1, p. 174-183, 1992.
- MELO, I. S. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Editora Embrapa: Jaguariúna SP, 1998. v. 1. p. 17-30.
- OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptides Antibiotics, Iturin A and Surfactant by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 517-519, 1995.
- OKU, H. Basic Principals of Plant Disease Control. In: OKU, H. **Plant Pathogenesis and Disease Control**. New York: CRC Press, INC., 1994. p. 1-2.
- OSBOURN, A. E. Pathogenicity of Black Rot Bacterium *Xanthomonas campestris* pathovar. *campestris* to Crucifers. In: SINGH, U. S.; SINGH, R. P.; KOHMOTO, K. **Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases**. Editora Pergamon, 1995, v. I: Prokaryotes, p. 153-165.

PICHARD, B., LARUE, J-P., THOUVENOT, D. Gavaserin and Saltavalin, new Peptide Antibiotics Produced by *Bacillus polymyxa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, p. 215-218, 1995.

PROKOF'EVA, N. G., et al. The Membranotropic Activity of Cyclic Acyldepsipeptides from Bacterium *Bacillus pumilus*, associated with the marine sponge *Ircinia* sp. **Toxicon**, n. 37, p. 801-813, 1999.

PUSEY, P. L. Use of *Bacillus subtilis* and Related Organisms as Biofungicides. **Pestic. Sci.**, v. 27, p. 133-140, 1989.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of Surfactin and Iturin A, Lipopeptides with Surfactant and Antifungal Properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 370-375, 1990.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SIKORA, E. J. Black Rot of Cabbage and Other Crucifers. **Net.**, Auburn University, jul.1994. Disponível em: <<http://www.aces.edu/departement/ipm/blackrot.htm>>. Acesso em: 27 set. 2000.

THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M. Current Concepts in the Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites. In: STACEY, G.; KEEN, N.T. **Plant-Microbe Interactions**. New York: Editora Chapman & Hall, 1996. v. 1, p. 187-235.

THOMSON, J. A. Biological Control of Plant Pests and Pathogens: Alternative Approaches. In: CHET, Ilan. **Biotechnology in Plant Disease Control**. New York: Editora Wiley-Liss, INC., 1993. p.275-290.

ULLRICH, C., et al. Cell-Free Biosynthesis of Surfactin, a cyclic Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 30, p. 6503-6508, 1991.

VATER, J. Lipopeptides, an Attractive Class of Microbial Surfactants. **Progr. Colloid & Polymer Sci.**, v. 72, p. 12-18, 1986.

WELLER, D. M. Biological Control of Soilborn Plant Pathogens in The Rhizosphere with Bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 26, p. 379-407, 1988.

WILLIAMS, P. H. Black Rot: A Continuing Threat to World Crucifers. **Plant Disease**, v. 64, n. 8, p. 736-742, 1980.

ZUBER, P.; NAKANO, M. M.; MARAHIEL, M. A. Peptide Antibiotics. In: SONENSHEIN, Abraham L.; HOCH, James A.; LOSICK, Richard. **Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria**. USA:1993. p 902-904.

ZUBER, P., MARAHIEL, M. P. Structure, Function and Regulation of Genes Encoding Multidomain Peptide Synthetases. In: STRHOL, William. **Biotechnology of Antibiotics**. New York USA: 1997. p. 189.