

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus* spp COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA
E ANTIMICROBIANA**

Raquel Homrich Lorentz
Bióloga - UFSM

Porto Alegre (RS)
Fevereiro, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus* spp COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA
E ANTIMICROBIANA**

Raquel Homrich Lorentz
Bióloga - UFSM

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, (RS)
Fevereiro, 2005

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Gertrudes Corção, pela colaboração e paciência em conduzir minhas pesquisas.

Às amigas e colegas do laboratório 166 do Departamento de Microbiologia, Alessandra Einsfeld, Daiana Morales, Natalia Canal, Juliana Flach, pelas sugestões e angústias compartilhadas.

À Sinara Ártico, bolsista de Iniciação Científica, pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Aos professores do PPGMAA, Dr^a Sueli Van Der Sand e Dr^a Marisa da Costa, pelas eficientes coordenadas. Às professoras Sueli Van Der Sand e Patrícia Valente pelas cepas de fungos e leveduras cedidas.

À colega de curso Michele Hoeltz pelas cepas de fungos cedidas.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial a Sayonara, pela atenciosa disposição em ajudar.

Ao meu irmão Leandro, pelo interesse, preocupação, conselhos e críticas.

Ao Petersson, pelas horas de estudo furtadas ao seu convívio e por tão bem compreender minhas privações.

Em especial, aos meus pais, Flavio e Miriam, pelo incentivo e apoio incondicional, sem os quais o presente trabalho não seria possível.

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Paenibacillus* spp COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTIMICROBIANA¹

Autor: Raquel Homrich Lorentz

Orientadora: Dra. Gertrudes Corção

RESUMO

As bactérias do gênero *Paenibacillus* são isolados de uma grande variedade de ambientes e tem como característica a produção e secreção de enzimas extracelulares, antimicrobianos e compostos antifúngicos inibidores de vários patógenos animais e vegetais. Os 55 isolados de 15 espécies de *Paenibacillus* foram testados frente a diversos substratos a fim de verificar a produção de enzimas extracelulares. Foram também testados frente a uma variedade de bactérias e fungos fitopatógenos, humanos e animais para a produção de antibióticos. Nessa triagem, *P. validus*, *P. chibensis*, *P. koreensis* e *P. peoriae* se destacaram inibindo a maioria das bactérias indicadoras. As espécies *P. validus*, *P. chibensis* e *P. peoriae* foram bons produtores de substâncias que inibiram o crescimento de fungos, demonstrando que o gênero possui um amplo espectro de atuação. O tradicional procedimento de triagem para obterem-se novos microrganismos produtores de enzimas para fins biotecnológicos foi executado neste trabalho. As 55 linhagens foram avaliadas na sua capacidade de produzir amilase, proteases (caseinase), celulase, xantanase, xilanase, pectinase, quitinase e lipase. Os isolados se mostraram bons produtores de enzimas hidrolíticas, já que 26 apresentaram atividade xilanolítica, 17 atividade pectinolítica, 49 atividade proteolítica, 43 atividade xantanolítica, 40 atividade celulolítica, 17 atividade lipolítica, 39 atividade amilolítica em condições neutras (pH 7) e 26 atividade amilolítica em condições alcalinas (pH 10), e apenas 4 apresentaram atividade quitinolítica. Sendo assim, esses isolados são candidatos a serem utilizados como agentes biocontroladores ou podem ser explorados como produtores de antimicrobianos e de enzimas hidrolíticas de interesse.

¹ Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (97p). Fevereiro de 2005.

SELECTION OF *Paenibacillus* spp STRAINS WITH ENZYMATIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY²

Author: Raquel Homrich Lorentz
Adviser: Dr. Gertrudes Corção, Ph.D.

ABSTRACT

Paenibacillus species can be isolated from many kinds of environments and they are known to be producers of extracellular enzymes and antimicrobial substances that inhibited many animal and plant pathogens. Fifty five isolates, belonging to fifteen different *Paenibacillus* species, were tested with different kind of substrates for the purpose of testing their extracellular enzyme production. In order to verify their antibacterial and antifungal activity, they were also screened against several human, animal and plant pathogenic bacteria and fungi. In the antimicrobial trial, *P. validus*, *P. chibensis*, *P. koreensis* and *P. peoriae* showed a broad spectrum antibacterial activity against the majority of the indicators strains. *P. validus*, *P. chibensis* and *P. peoriae* showed a good antifungal activity. These results indicated that *Paenibacillus* genus have a broad antimicrobial spectrum. The traditional method to search new microorganisms producers of extracellular enzymes was applied in the present study. The 55 isolates were analysed to check their ability to produce amylases, proteases, cellulases, xanthanases, xylanases, pectinases, chitinases and lipases. The isolates turn to be good producers of hydrolytic enzymes, once 26 presented xylanolytic activity; 17, pectinolytic activity; 49, proteolytic activity; 43, xanthanolytic activity; 40, cellulolytic activity; 17, lipolytic activity, 39 had amylolytic activity at neutral conditions and 26, had amylolytic activity at alkaline conditions. Only four strains presented chitinolytic activity. So these strains are potential candidates to be used as biocontrol agents or exploited as antimicrobial and enzyme producers.

² Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (97p). Fevereiro 2005.

SUMARIO

	Página
RELAÇÃO DE TABELAS.....	Viii
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	03
2.1 O gênero <i>Paenibacillus</i>	03
2.2 Atividade antimicrobiana.....	05
2.3 Utilização como probiótico.....	07
2.4 As enzimas Extracelulares de bactérias formadoras de esporos.....	09
2.4.1 Pectinase.....	09
2.4.2. Quitinase.....	10
2.4.3 Celulase.....	12
2.4.4 Lipase.....	14
2.4.5 Xilanase.....	16
2.4.6. Protease.....	19
2.4.7. Xantanase.....	21
2.4.8. Amilase.....	22
2.5 Controle Microbiológico.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Meios de cultura.....	28
3.2 Cepas Utilizadas.....	28
3.3 Padronização da Curva de Desenvolvimento.....	28
3.4 Determinação da Atividade Antibacteriana.....	30
3.4.1Triagem dos isolados produtores de substancias antibacterianas.....	30
3.5 Determinação da Atividade Antifúngica.....	32
3.5.1 Preparação da suspensão de esporos.....	32
3.5.2Triagem dos isolados produtores de substancias antifúngicas.....	32
3.2.5.1 Fungos filamentosos.....	32
3.2.5.2 Leveduras.....	33
3.6 Produção de enzimas extracelulares.....	33
3.6.1 Substratos testados.....	33
3.6.2Triagem dos isolados produtores de enzimas extracelulares.....	34
3.6.2.1 Xilanase.....	34
3.6.2.2 Pectinase.....	34
3.6.2.3 Lipase.....	35
3.6.2.4 Amilase ativa em pH neutro – pH 7.....	36
3.6.2.5 Amilase ativa em pH alcalino – pH 10.....	37
3.6.2.6 Protease.....	37
3.6.2.7 Celulase.....	38

3.6.2.8 Atividade Xantanolítica.....	39
3.6.2.9 Quitinase.....	39
3.7 Atividade Antimicrobiana do Sobrenadante de Cultura.....	40
3.8 Quantificação da Atividade Antimicrobiana.....	41
3.9 Testes em tubérculos de batata <i>in vivo</i>	41
3.9.1 Microrganismos patogênicos utilizados.....	41
3.9.2 Preparação da cultura de células e de esporos de <i>Paenibacillus</i>	41
3.9.3 Aplicação <i>in vivo</i>	42
3.10 Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Padronização da Curva de crescimento e Esporos.....	44
4.2 Determinação da Atividade Antibacteriana.....	45
4.3 Atividade Antifúngica.....	52
4.4 Atividade do Sobrenadante da cultura.....	56
4.5 Detecção da Atividade Hidrolítica.....	64
4.6 Atividade antifúngica e Produção de Enzimas Hidrolíticas por <i>Paenibacillus</i>	74
4.7 Testes <i>in vivo</i> com tubérculos de batata.....	77
5. CONCLUSÃO.....	80
6. PERSPECTIVAS.....	82
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8. APÊNDICE.....	95
8.1 Meio de Cultura Utilizados nos testes com Antimicrobianos.....	95
8.2 Reagentes Utilizados.....	96

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Espécies de <i>Paenibacillus</i> isolados de amostras de água e solo.....	29
2. Cepas indicadoras utilizadas, suas origens e condições de crescimento..	31
3. Atividade antibacteriana de <i>Paenibacillus</i> spp isolados de solo frente a 16 bactérias indicadoras.....	47
4. Atividade antibacteriana de cepas de <i>Paenibacillus</i> spp isolados de água frente a 16 bactérias indicadoras.....	48
5. Atividade antifúngica de <i>Paenibacillus</i> frente a cepas indicadoras de fungos filamentosos.....	53
6. Inibição de espécies de <i>Candida</i> spp por cepas de <i>Paenibacillus</i>	57
7. Isolados produtores de sobrenadantes ativos contra bactérias indicadoras.....	59
8. Isolados produtores e sobrenadantes ativos contra fungos filamentosos.....	62
9. Inibição de espécies de <i>Candida</i> spp pelo sobrenadante de <i>Paenibacillus</i>	63
10. Perfil enzimático de cepas de <i>Paenibacillus</i> spp provenientes de amostras de água.....	65
11. Perfil enzimático de cepas de <i>Paenibacillus</i> spp provenientes de amostras de solo.....	66
12. Atividade antifúngica e produção de enzimas hidrolíticas por cepas de <i>Paenibacillus</i> spp.....	76

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Curvas de crescimento de três espécies de <i>Paenibacillus</i>	45
2. Efeito inibitório de <i>Paenibacillus validus</i> (isolado 10M) nas estrias verticais contra as bactérias indicadoras <i>Xanthomonas axonopodis</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. coli</i> nas estrias horizontais (de cima para baixo).....	50
3. Padrão de Inibição de cepas indicadoras pelas espécies de <i>Paenibacillus</i> que apresentaram alguma atividade inibitória.....	51
4. Efeito inibitório de <i>P. peoriae</i> sobre o fungo <i>Bipolaris sorokiniana</i> . A) controle do crescimento da cepa de <i>B. sorokiniana</i> 019/92 após 10 dias de crescimento. B) Inibição da cepa de <i>B. sorokiniana</i> 019/92 por <i>P. peoriae</i> , isolado 57 após 10 dias de crescimento.....	54
5. Halos de inibição dos sobrenadantes dos isolados de <i>P. chibensis</i> (17b, 23), <i>P. koreensis</i> (32M), <i>P. illinoiensis</i> (23M), <i>P. brasilensis</i> (16) e <i>P. validus</i> (10M) frente a bactéria indicadora <i>Listeria innocua</i> , em TSA.....	59
6. Percentagem do perfil enzimático de cepas de <i>Paenibacillus</i>	67
7. Lesões em tubérculos de batata provocadas por culturas de células de <i>Paenibacillus</i> . A e C: controles com as culturas de células dos isolados 10M e 191 respectivamente. B e D: tratamentos com as mesmas culturas de 10M e 191 e 10 ⁶ células de <i>Pectobacterium carotovorum</i>	79

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Paenibacillus* podem ser isolados em grande variedade de ambientes, como água, solo, rizosferas, materiais vegetais, larvas de insetos e sedimento marinho contaminado com petróleo. Este grupo tem como característica a produção de enzimas extracelulares que degradam polissacarídeos como quitina, celulose, amido e são hábeis também em produzir e secretar compostos antimicrobianos e antifúngicos.

A habilidade desses microrganismos em produzir e secretar uma variedade de enzimas e antimicrobianos é de grande importância, pois agem como biocontroladores de microrganismos patogênicos e podem ser usados como alternativa no tratamento de efluentes de processos industriais diminuindo a liberação de poluentes no ambiente.

O gênero *Bacillus* vem sendo bastante pesquisado quanto a estas características e quanto ao uso no controle biológico e produção de enzimas. Como o gênero *Paenibacillus* também pertence à família *Bacillaceae*, é importante avaliar estas características nesse novo grupo, a fim de que seja

possível caracterizar novas bactérias que possam vir a ser utilizadas no controle biológico, na biodegradação de subprodutos industriais e na indústria farmacêutica.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Departamento de Microbiologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e teve como objetivos:

- Testar a atividade antibacteriana e antifúngica dos isolados frente a bactérias e fungos patogênicos.

- Realizar uma triagem entre os isolados de *Paenibacillus* para linhagens produtoras de enzimas com atividade lipolítica, quitinolítica, amilolítica, xilanolítica, xantanolítica, pectinolítica, celulolítica e proteolítica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Paenibacillus*

O gênero *Paenibacillus* compreende um grupo de organismos em forma de bastonete, aeróbios ou anaeróbios facultativos que produzem esporos elípticos. Fenotipicamente, as espécies deste grupo reagem fracamente com a coloração de Gram, apesar de ter a estrutura Gram-positiva. É um grupo heterogêneo, com indivíduos exibindo uma grande diversidade de requerimentos nutricionais, condições de crescimento, metabolismo e composição de DNA. São móveis possuindo flagelos peritríquios e não produzem pigmentos (Ash et al. 1993). Alguns são patógenos e causam doenças em larvas e pupas de insetos economicamente importantes (Allippi & Aguilar 1998, Heyndrickx et al. 1996a).

Espécies de *Paenibacillus* têm sido isoladas de uma grande variedade de fontes como solo (Berge et al. 2002), água, rizosferas, materiais vegetais, alimentos, raízes de árvores, alimentos, forragem, fezes e larvas de insetos (Daane et al. 2002), e uma espécie foi isolada de materiais clínicos (Booshard, Zbinden & Altwegg, 2002). Junto com o gênero *Bacillus*, é o mais freqüentemente

encontrado em alimentos estocados sob temperatura de refrigeração (abaixo de 10°C) (Girardin et al. 2002).

A principal característica do grupo é a secreção de enzimas extracelulares, polissacarídeos, aminoácidos e metabólitos secundários (Yoon et al. 2003), como *P. validus* que degrada hidrocarbonetos poliaromáticos, (Daane et al. 2002), *P. alginolyticus* e *P. chondroitinus* que degradam alginato (Shida et al. 1997a), *P. agaridevorans*, uma das poucas espécies capazes de degradar ágar (Uetanabaro et al. 2003). Alguns são conhecidos por produzirem polissacarídeos (Yoon et al. 2002), Há ainda espécies que habitam o solo e são importantes na fixação de nitrogênio, como *P. borealis* (Elo et al. 2001), *P. brasilensis* (Von der Weid et al. 2002). Algumas espécies ainda são produtoras de enzimas extracelulares em meio alcalino, sendo denominadas bactérias alcalifílicas, como *P. campinasensis* (Yoon et al. 1998) e *P. daejeonensis* (Lee et al. 2002). Alguns são utilizados no tratamento de efluentes de indústrias têxteis, como o *P. azoreducens*, que degrada um descorante comumente utilizado que contém um grupo azo (derivados das aminas) e é considerado um poluente importante porque tem como produto resultante da degradação, aminas com efeitos tóxicos, carcinogênico e mutagênico (Meehan, Bjourson & McMullan, 2001). *Paenibacillus koreensis* produz compostos antifúngicos inibidores do crescimento de vários patógenos de plantas e animais, sendo que esta espécie é usada como controlador biológico de fungos devido à sua habilidade em degradar quitina, o maior componente de parede celular desses organismos (Chung et al. 2000).

2.2 Atividade antimicrobiana

As bactérias do gênero *Paenibacillus* são produtoras de metabólitos secundários, compostos especiais com estruturas diferentes dos metabólitos primários como açúcares, peptídeos e ácidos orgânicos, dos quais são derivados. Entre esses compostos estão: antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição, simbiose, inibidores de enzimas, feromônios e promotores de crescimento animais e vegetais. Os metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento dos microrganismos, mas é uma via alternativa que colabora para sua sobrevivência na natureza (Martin & Demain, 1980).

Antibióticos são um grupo de compostos orgânicos heterogêneos, de baixo peso molecular, que em pequenas concentrações são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros microrganismos. Nos últimos 10 anos, têm-se isolado vários antibióticos de vários gêneros de microrganismos, como *Bacillus cereus*, produtor da Kanosamina e Zwittermycin A (Milner et al. 1996), *B. subtilis*, produtor da bacilosina (Tamehiro et al. 2002), *B. licheniformes*, produtor do Fungicin M4 e bacitracina (Lebbadi et al. 1994), *Pseudomonas*, produtora das Fenazinas e oomicina A, *Paenibacillus polymyxa*, produtor da polixina (Piuri et al. 1998), polimixina, gavaserin e saltavalin (Pichard, Larue & Thouvenot, 1995), o gênero *Streptomyces*, produtor de uma variedade de metabólitos secundários, que compreende a metade dos antibióticos conhecidos (Tamehiro et al. 2003).

Esses compostos antibióticos são classificados de acordo com a forma com que são sintetizados, assim, podem ser produzidos sem a participação direta

dos ribossomos (antibióticos não ribossomais), ou podem ser codificados por genes, sendo assim, sintetizados ribossomicamente (Tamehiro et al. 2002). Os antibióticos são produzidos sem a participação direta do ribossoma através de uma série de reações catalisadas por enzimas multifuncionais, denominadas peptídeo sintases, possuem estruturas lineares ou cíclicas, sendo compostos por aminoácidos modificados, incluindo ácidos graxos, hidroxiácidos (Martin & Demain, 1980) Esses compostos são produzidos e secretados durante a fase estacionária de crescimento e tem relação com o aumento da competição durante a germinação dos esporos (Tamehiro et al. 2002).

Os antibióticos ribossomalmente sintetizados são catiônicos e a maioria deles, matam bactérias por permitir a permeabilização da membrana plasmática da célula alvo. Provavelmente sua carga positiva facilita a interação com o fosfolípídeo da membrana, carregado negativamente e com a parede celular de característica ácida. Antibióticos polipeptídeos produzidos ribossomalmente por bactérias são chamados bacteriocinas (Nissen-Meyer & Ingolf et al. 1997).

A ação dos antibióticos sobre os microrganismos pode provocar dois tipos de efeito, desde que este seja sensível: a morte (efeito bactericida) ou interrupção de seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático). Estes efeitos são determinados por mecanismos de ação, exercido por alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática (Oscariz & Pisabarro, 2001), interferindo na síntese da parede celular ou na biossíntese de componentes celulares essenciais (De Lucca & Walsh, 1999) e enzimas celulares (Oscariz & Pizabarro, 2000).

O gênero *Paenibacillus* esta sendo estudado e já é comprovada a ação antibiótica frente a um amplo espectro de microrganismos como fungos filamentosos (Nielsen & Sorensen, 1997; Dijksterhuis et al. 1999) bactérias (Seldin et al. 1999), inclusive patógenos anaeróbios importantes como *Clostridium botulinum* (Girardin et al. 2002).

2.3 Utilização como probiótico

O gênero *Bacillus* vem sendo bastante pesquisado quanto ao uso no controle biológico, produção de enzimas e em seu potencial como probiótico (Duc & Cutting, 2003; Duc et al. 2004), já que são microrganismos produtores de esporos bastante utilizados como suplemento alimentar nas rações para animais, como galinhas, porcos, bovinos (Jadamus, Vahjen & Simon, 2001) e crustáceos (Rengpipat et al. 2003).

O termo "probiótico" é definido como organismos vivos que ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da flora bacteriana intestinal do hospedeiro pois aumentam os mecanismos de defesa do animal sem perturbar as funções fisiológicas e bioquímicas normais.

Como função benéfica no organismo, os probióticos têm efeito sobre o equilíbrio bacteriano intestinal, controlando o colesterol e diarreias (Reque et al. 2000). O meio de atuação dos probióticos no organismo se refere principalmente à inibição que estes exercem na colonização do intestino por bactérias patogênicas. Os mecanismos através dos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas seriam a produção de substâncias bactericidas; disputa por

nutrientes; alteração do metabolismo microbiano; estímulo do sistema imunológico a partir da capacidade de adesão à mucosa intestinal (Casula & Cutting, 2002).

Os organismos com potencial para serem utilizados como probióticos devem apresentar algumas características específicas: reproduzirem-se rapidamente; produzirem substâncias antimicrobianas; resistirem ao tempo entre a fabricação, comercialização e ingestão do produto devendo atingir o intestino ainda vivos. Essas características conferem vantagem aos microrganismos produtores de esporos, já que estes, após serem ingeridos, germinam rapidamente no ambiente intestinal, sendo possível detectar a germinação repetida das células vegetativas durante a passagem intestinal (Jadamus, Vahjen & Simon, 2001).

2.4 ENZIMAS EXTRACELULARES EM *Paenibacillus*

2.4.1 Pectinases

Pectinas são heteropolissacarídeos complexos formados por um esqueleto de ácido galacturônico ligados por ligações α -1,4 a resíduos de glicose, ramnose, galactose, etc. Baseado no grau de esterificação, as substâncias pecticas recebem uma denominação, protopectina, ácidos pecticos, ácidos pectínicos e pectinas (Kashyap et al. 2001). É encontrada na parede celular dos vegetais e pode estar interligada à outros polissacarídeos e proteínas formando uma rede insolúvel, conferindo rigidez à parede celular vegetal. Durante o processo de apodrecimento, essa estrutura é alterada por enzimas que ocorrem

naturalmente nas frutas, resultando num composto solúvel ao redor das células tornando o tecido mole (Kashiap et al. 2001).

Enzimas pectinolíticas são produzidas também por fungos e bactérias, patógenos de plantas que causam a queda de folhas, murcha e podridão. (Kobayashi et al. 2001). Por outro lado, as pectinases são enzimas de importância industrial na extração, clarificação e liquefação de sucos de frutas e vinhos (Kashyap et al. 2001; Bhat, 2000; Tamburini et al. 2003). Essas enzimas também são utilizadas na indústria têxtil no amaciamento de fibras como linho e juta (Cao, Zheng & Chen, 1992; Tamburini et al. 2003), na indústria do papel evitando problemas de retenção de partículas nos filtros (Horikoshi, 1999), na extração de óleos de canola, coco, girassol, óleo de oliva, na fermentação do café e chás, na indústria de rações para animais, no tratamento de efluentes das indústrias de processamento de sucos e no isolamento de protoplastos para manipulação genética (Kashyap et al. 2001; Bhat, 2000).

As pectinases são divididas de acordo com suas aplicações em pectinases ácidas e pectinases alcalinas.

As pectinases ácidas são extraídas dos fungos, especialmente de *Aspergillus niger* e são utilizadas na indústria de sucos de frutas, vinhos e cidra. Ainda são utilizadas em rações para animais à partir das sobras da extração de sucos cítricos que ficam nos extratores (Kashyap et al. 2001).

As pectinases alcalinas são utilizadas no amaciamento de fibras vegetais, através de uma fermentação em que microrganismos decompõem a pectina da casca da planta liberando a fibra. São utilizadas ainda no tratamento de efluentes, na produção de papel, sendo superior em qualidade, resultando em um

papel mais uniforme e macio (Horikoshi, 1999). Na indústria, as pectinases alcalinas utilizadas são principalmente de bactérias do gênero *Bacillus* (Kobayashi et al. 2001; Tamburini et al. 2003).

2.4.2 Quitinases

A quitina, um polímero insolúvel, linear de N-acetilglucosamina. É um dos mais abundantes polissacarídeos na natureza. Comum no exoesqueleto de insetos, algas, crustáceos e parede dos fungos (Watanabe et al. 1990; Yang et al. 2000). A quitina e seus derivados têm chamado atenção devido a suas versáteis atividades biológicas como aumento da imunidade, flocculante em estações de tratamento esgoto e como agroquímico (Yang et al. 2000; Wang & Chang, 1997)

Quitinases são glicano hidrolases encontrados em plantas, fungos, nematódeos e alguns vertebrados, e são importantes na nutrição de saprófitos do solo e da água e conseqüentemente na reciclagem de materiais contendo quitina, (Folders et al. 2001; Trachuk et al. 1996). Em plantas, a produção de quitinases esta relacionada a resposta a infecções provocadas por fungos patogênicos (Watanabe et al. 1990). Entre as bactérias, os gêneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Vibrio* possuem as maiores atividades quitinolíticas (Trachuk et al. 1996). A produção de quitinases é normalmente regulada pela presença do substrato, pois sua síntese é reprimida quando a bactéria cresce em um meio rico e só induzida quando crescem em meio mínimo suplementado com quitina como única fonte de carbono (Folders et al. 2001).

A produção de enzimas quitinolíticas é um importante elemento na utilização de resíduos de escamas de peixes e cascas de crustáceos, pois não só

resolve problemas ambientais, mas também diminui o custo da produção de quitinas microbianas (Wang & Hwang, 2001). Estes restos marinhos, como cascas de crustáceos e escamas de peixes contém além da quitina, proteína e compostos inorgânicos, como o carbonato de cálcio (Yang et al. 2000). Tradicionalmente, a preparação da quitina a partir de restos marinhos envolve a desmineralização e desproteínização com o uso de ácidos e bases fortes, o que além de resultar em um produto com propriedades inconsistentes, causa um problema de descarte, já que uma neutralização e desintoxicação do efluente deverão ser feitas antes da liberação no ambiente (Yang et al. 2000).

2.4.3 Celulases

Celulose, o componente mais abundante encontrado na natureza quase que exclusivamente nas paredes das células vegetais, também é produzida por alguns animais como os tunicados e por algumas bactérias (Lynd et al. 2002). É um polissacarídeo composto de unidades de β -D-glicopiranosil unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (Gilkes et al. 1991). Na maioria dos casos a celulose não está presente num estado puro e sim formando fibras que estão embebidas numa matriz de outros biopolímeros como hemiceluloses e lignina (Robson & Chambliss, 1989). Uma importante característica da celulose, é sua estrutura cristalina, a qual permite que as fibras sejam empacotadas próximas prevenindo a penetração tanto de enzimas como de moléculas pequenas como a água (Lynd et al. 2002).

Entre as bactérias há uma diferença entre as estratégias de utilização da celulose entre organismos aeróbios e anaeróbios. Microrganismos anaeróbios,

não liberam as enzimas no meio extracelular e sim mantêm um sistema enzimático complexo (celulossoma) em suas paredes produzindo pequenas quantidades da enzima e o resultado da degradação são produtos de fermentação como etanol, ácidos orgânicos, CO₂ (Lynd et al. 2002). Microrganismos com metabolismo oxidativo produzem grandes quantidades de enzimas que são secretadas para o meio de cultura e podem ser recuperadas nos sobrenadantes, além de terem altas produções, característica do metabolismo aeróbio (Lynd et al. 2002). É importante notar que a maioria das bactérias celulolíticas do solo (*Bacillus*, *Micromonospora*, *Thermobifida*) também são produtoras de metabólitos secundários e endósporos, habilidades importantes que conferem vantagens seletivas na natureza (Lynd et al. 2002).

Para os microrganismos hidrolisarem e metabolizarem celulose insolúvel, celulases extracelulares devem ser produzidas, essas podem ser livres ou associadas à célula (Lynd et al. 2002). Assim, o sistema enzimático é formado por três enzimas: as endo- β -1,4-glicanases, as exo - β -1,4-glicanases (celobiohidrolases) e as β -glicosidases (celobiases). Essas três enzimas agem sinergisticamente para hidrolisarem a celulose cristalina. O efeito do sistema de enzimas é a rápida diminuição do comprimento do polímero e o aumento do número de açúcares redutores (Robson & Chambliss, 1989).

Estudos com celulases produzidas por bactérias do gênero *Paenibacillus* já estão sendo feitos com bons resultados, podendo ser uma ferramenta importante com aplicações na indústria (Sanchez et al. 2004).

O progresso nos estudos das celulases e enzimas relacionadas estão atraindo atenções, pois recentes descobertas nas áreas da bioquímica, genética,

proteínas e enzimas de bactérias e fungos têm levado a antecipação do potencial comercial dessas enzimas (Bhat, 2000).

O potencial biotecnológico das celulases é imenso, nas indústrias de alimentos, na clarificação de sucos de frutas e vegetais, na extração de óleo de oliva, na produção de cerveja e vinhos. Em rações para animais, aumentando seu valor nutricional e a digestibilidade. Na indústria de têxteis, modificando as fibras aumentando a qualidade e amaciando os tecidos. Em detergentes e sabões em pó, melhorando as cores e removendo a sujeira. Aplicações na agricultura, como biocontroladores de doenças e promovendo o crescimento de plantas (Bhat, 2000).

2.4.4 Lipases

As lipases são glicerol éster hidrolases que catalisam a quebra de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos (Sommer, Bormann & Gotz, 1997), agindo nas ligações éster carboxil presentes nos acilgliceróis (Jaeger et al. 1994).

A lipólise acontece exclusivamente na interface lipídeo-água, e a concentração de substrato é que determina a taxa de quebra (Jaeger & Reetz, 1998). As lipases de origem microbiana são as mais versáteis e conseguem fazer um grande número de reações, como hidrólise, esterificação, alcoólise (Haki & Rakshit, 2003).

As funções fisiológicas das lipases e esterases estão envolvidas em prover fontes de carbono durante a degradação de substratos, como fator de virulência em alguns gêneros como *Staphylococcus* e *Pseudomonas* ou

detoxificação de biocidas (Prim et al. 2000). As lipases também exercem certas funções fisiológicas nas células e membranas, como o metabolismo de lipídios e lipopolissacarídeos (Jaeger et al. 1994).

Lipases extracelulares normalmente aparecem no meio de cultura quando as células bacterianas chegam ao fim da fase logarítmica de crescimento. Existem uma variedade de condições que influenciam a produção dessas lipases, altas concentrações de ferro no meio reprimem a síntese assim como as limitações de fontes de carbono e energia aumentam a produção (Jaeger et al. 1994).

As aplicações das lipases alcalinas em formulações de detergentes têm sido mais estudadas. Várias lipases com alto nível de atividade em pHs alcalinos foram obtidas de microorganismos, alguns pertencentes ao grupo dos alcalifílicos, que se caracterizam por ter seu crescimento ótimo em pHs alcalinos (Lin et al. 1996).

As razões para o potencial biotecnológico das lipases microbianas, produzidas especialmente pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* e por fungos filamentosos, está no fato de que possuem certas características desejáveis, são estáveis em solventes orgânicos, não requerem cofatores, e agem numa ampla gama de substratos. Várias lipases tem sido produzidas comercialmente e a grande maioria é originada de bactéria e fungos (Jaeger & Reetz, 1998). Vários *Bacillus* sp. são consideradas as maiores fontes de enzimas lipolíticas (Haki & Rakshit, 2003).

A aplicação mais importante das lipases é na indústria de detergentes para roupas e louças, mas também são utilizadas como ingrediente em alimentos,

na indústria do papel, na emulsificação de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, no desenvolvimento de sabor em produtos lácteos, remoção da gordura subcutânea na indústria do couro (Jaeger & Reetz, 1998; Haki & Rakshit, 2003) e no futuro pode ser uma arma na prevenção e limpeza de resíduos formadores de filmes de gordura em efluentes (Jaeger & Reetz, 1998).

Há uma crescente preocupação sobre os efeitos dos processos de lavagem no meio ambiente, além da necessidade da diminuição das temperaturas de lavagem a fim de economizar energia, esses são os maiores desafios que impulsionam o desenvolvimento de novas tecnologias que solucionem esses problemas. A descoberta de novas lipases que agem em temperaturas baixas e em pH alcalino vem solucionar esses problemas, como a “Lipolase”, uma formulação comercial contendo lipases (Falch, 1991; Jaeger et al. 1994), a “Lumafast” e a “Lipomax” (Jaeger et al. 1994).

O aumento no interesse do estudo das lipases microbianas levou ao melhoramento de cepas produtoras e das propriedades bioquímicas das enzimas lipolíticas. Cepas de *Paenibacillus* spp já foram pesquisadas e provaram produzir enzimas que degradam lipídios, potencialmente úteis na indústria e biotecnologia (Prim et al. 2000).

2.4.5 Xilanases

A xilana é um biopolímero abundante em tecidos vegetais (Blanco et al. 1995), sendo encontrada nas paredes secundárias das células das plantas (Subramaniyan & Prema, 2002).

As xilanas formam o grupo das hemiceluloses que constituem a madeira, sendo (35 a 50% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 20 a 30% de lignina) (Kulkarni et al. 1999; Subramaniyan & Prema 2000,). Sendo composta de um esqueleto de unidades de D-xilopiranosil ligadas por ligações β -1,4, com graus variados de substituição (Kulkarni et al. 1999; Subramaniyan & Prema, 2002).

A biodegradação da xilana requer a ação de várias enzimas que são produzidas por microrganismos xilanolíticos, e agem em sinergismo (Thomson, 1993). As endo- β -1,4-xilanases, que clivam o esqueleto de xilana, liberando unidades de xilooligossacarídeos, as β -xilosidases, que clivam os pequenos fragmentos liberando a xilose. (Kulkarni et al. 1999; Subramaniyan & Prema, 2002). Muitas enzimas celulolíticas também têm atividade xilanolítica como uma função secundária (Thomson, 1993).

A produção de xilanase por fungos e bactérias mostrou ser indutível, mas há raros exemplos da expressão de xilanases constitutivas (Srivastava & Srivastava *apud* kulkarni et al. 1999). A xilana, sendo um biopolímero de alto peso molecular, não consegue penetrar na parede celular, assim pequenos fragmentos de xilana, os xilooligossacarídeos liberados pela ação de pequenas quantidades de enzima produzida constitutivamente, tem papel fundamental na degradação desse biopolímero (Bajpai, 1997; Kulkarni et al. 1999).

O interesse na aplicação de xilanases na indústria tem aumentado nos últimos anos, devido a sua importância na indústria do papel em rações para animais e na indústria de pães (Blanco et al. 1995).

As xilanases são de grande importância para a indústria do papel, pois a hidrólise da xilana facilita a liberação da lignina e reduz o uso do cloro como

agente branqueador. A preocupação com o impacto de poluentes provenientes da indústria do papel força a pesquisa por novas técnicas de branqueamento, já que o clareamento convencional da polpa do papel, que é escura por causa da lignina, libera compostos fenólicos clorados. Estudos têm sido feitos sobre os efeitos de efluentes da indústria do papel, nos quais constata-se que a maioria dos compostos cloroaromáticos liberados no ambiente são tóxicos e acumulam-se nos componentes bióticos e abióticos do ecossistema (Viikari et al. 1994; Blanco et al. 1995; Subramaniyan & Prema, 2002;).

Outras áreas onde o sistema de xilanases produzidas por microrganismos é explorado são o melhoramento da degradação das hemiceluloses no rúmem de animais ruminantes, já que as xilanas representam a maior fonte de energia para esses microrganismos fermentadores, no uso de enzimas termostáveis na conversão de hemiceluloses em matéria prima para produtos químicos e rações, na eliminação de restos provenientes da agricultura e no biocontrole da fitopatogênese (Thomsom, 1993; Subramaniyan & Prema, 2002). A aplicabilidade das xilanases também está no aumento do uso de certos materiais como Rayon, celofane e outros químicos produzidos da polpa do papel dissolvida (Subramaniyan & Prema, 2002), como espessante e anticongelante em alimentos (Kulkarni et al. 1999).

A pesquisa por microorganismos que produzem e secretam xilanases já foi iniciada com *Bacillus* spp, devido à alta produção de xilanases com atividade em pH alcalino. As bactérias do gênero *Bacillus* são industrialmente importantes por serem fontes de hemicelulases, mas ainda pouco se sabe sobre as atividades

hidrolíticas dessas enzimas produzidas por esses microorganismos (Subramaniyan & Prema, 2000).

O gênero *Paenibacillus* tem grande potencial de utilização na indústria, já tendo endo- β -1,4-xilanase e β -xilosidases estudadas e seus genes clonados e seqüenciados (Gosalbes et al. 1991).

2.4.6 Proteases

Enzimas proteolíticas catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, resultando em hidrólise total dessas proteínas (Rao et al. 1998), são enzimas constituintes de todas as formas de vida, desde procariotos até animais (Gupta, Beg & Lorenz, 2002).

Proteases de origem microbiana são classificadas em vários grupos. Quanto a natureza do sítio ativo (serínicas, cisteínicas, aspartínicas ou metálicas), quanto ao modo de atuação (endo e exopeptidases) (HAKI & RAKSHIT, 2003), e quanto a tecnologia (ácidas ou alcalinas, termoestáveis ou não) (Gupta, Beg & Lorenz, 2002). Microorganismos elaboram vários tipos de proteases, que podem ser intracelulares, importantes nos processos celulares como esporulação e diferenciação, maturação de enzimas, reciclagem de proteínas e manutenção do “pool” de proteínas. As proteases extracelulares são importantes na hidrólise de proteínas e habilitam a célula a absorver e utilizar os produtos dessa hidrólise (Gupta, Beg & Lorenz, 2002).

A produção de proteases por microorganismos é grandemente influenciada pelos componentes do meio, como carbono, nitrogênio, íons metálicos, fatores físicos como temperatura, pH, tempo de incubação (Puri, Beg & Gupta,

2002). A síntese de proteases por bactérias do gênero *Bacillus* é constitutiva ou parcialmente indutível e controlada por vários mecanismos que operam durante a transição da fase exponencial e fase estacionária de crescimento (Kumar & Takagi, 1999). Além de variar enormemente na suas propriedades catalíticas e fisicoquímicas, por exemplo, a síntese é suprimida pela presença de fonte de nitrogênio metabolizável no meio, como aminoácidos e amônia (Kaur et al. 2001).

Essas enzimas são importantes nos processos metabólicos, mas também têm recebido a atenção da comunidade industrial (Gupta, Beg & Lorenz, 2002), sendo que proteases representam um dos maiores grupos de enzimas utilizados na indústria, e cerca de 60% das vendas de enzimas no mundo (Rao et al. 1998). Proteases oriundas do gênero *Bacillus* fazem parte de 20% do mercado de enzimas, com predominante aplicação em detergentes (Kaur et al. 2001), devido a sua capacidade de secretar grandes quantidades de proteína no meio (Christiansen & Nielsen, 2002).

Seguindo a nova tendência de desenvolvimento de novos produtos e processos limpos para o ambiente, as proteases têm aplicações no tratamento do couro (hidrolisando os constituintes da pele e removendo o pêlo com menor geração de efluente tóxico), na indústria de alimentos (queijos, pães, produtos de soja, produção de hidrolisados de soja para nutrição de crianças e idosos e síntese do aspartame) na indústria farmacêutica (Gupta, Beg & Lorenz, 2002; Rao et al. 1998; Kumar & Takagi, 1999), tem papel crucial na pesquisa básica (elucidação de estruturas, síntese e seqüenciamento de peptídeos) e em vários processos de bioremediação (Rao et al. 1998; Kumar & Takagi, 1999).

2.4.7 Enzimas Xantanolíticas

A xantana é um polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria fitopatogena *Xanthomonas campestris* (Nankai et al. 1999). Pode ser produzido comercialmente através da fermentação de amido ou glicose, seguida de uma degradação que combinam processos ácidos com degradação enzimática (Papagianni et al. 2001; Kiosseoglou et al. 2003). É um biopolímero composto por um esqueleto de celulose com cadeias laterais de trissacarídeos (seqüências de manosil-glucoronil-manose) (Hashimoto et al. 1998). Usado na indústria para aumentar a densidade em soluções aquosas e como estabilizador de emulsões e suspensões particuladas, também usado na indústria de alimentos, como sucos, sorvetes, molhos para salada e na indústria de explosivos, tintas, líquidos para extintores e cosméticos.

A descoberta de novas cepas produtoras de enzimas que hidrolisam a xantana será útil para o tratamento de infecções e doenças causadas por *Xanthomonas*, uma vez que é o principal fator de virulência contra plantas (NANKAI et al. 1999). Tais enzimas podem ser também utilizadas na preparação de xantano modificado com novas propriedades físico-químicas que resultem em novas aplicações na indústria de biopolímeros (Hashimoto et al. 1998; Nankai et al. 1999).

Há dois tipos de enzimas que degradam a xantana produzidas por microrganismos, uma endo-1,4 β -glucanase que catalisa a hidrólise da cadeia principal do xantano, e uma transeliminase, que cliva as cadeias laterais de trissacarídeos, esta pouco caracterizada (Hashimoto et al. 1998).

Enzimas com atividade xantanolítica são obtidas de microrganismos que conseguem utilizar a xantana como única fonte de carbono para seu crescimento, há trabalhos que confirmam a secreção dessas enzimas em indivíduos dos gêneros *Bacillus* (Cadmus et al. 1982; Hashimoto et al. 1998; Nankai et al. 1999;) e *Paenibacillus* (Ruijssenaars, Bont & Hartmans, 1999).

2.4.8 Amilases

As α -amilases constituem uma família de hidrolases encontrada de eubactérias a eucariotos (Oudjeriouat et al. 2003) que clivam as ligações α 1-4 no amido e polímeros assemelhados (Nielsen & Borchert, 2000). São responsáveis pela solubilização do amido, que é composto de dois polímeros de glicose a amilose (de estrutura linear) e a amilopectina (de estrutura ramificada) (Nielsen & Borchert, 2000; Oudjeriouat et al. 2003). Assim como os outros polímeros, o amido requer uma combinação de enzimas para sua completa hidrólise, como as α -amilases, glicoamilases e as β -amilases (Hagihara et al. 2001; Haki & Rakshit, 2003). As amilases são classificadas ainda de acordo com o local de ação, podem ser endo ou exo enzimas. As α -amilases são endo enzimas que hidrolisam as ligações em locais ao acaso, liberando oligossacarídeos lineares ou ramificados. As exo amilases agem nos terminais do substrato, liberando monossacarídeos (Haki & Rakshit, 2003).

O amido, principal componente da nossa dieta diária, tem aplicações, como na produção de pães, xaropes de glicose/frutose, álcool combustível de amido. Enzimas amilolíticas, especialmente as α -amilases são importantes na indústria de alimentos e de detergentes (Hagihara et al. 2001), sendo responsável

por 30% do consumo de enzimas no mundo (Haki & Rakshit, 2003). Na indústria de alimentos é utilizada na liquefação do amido, produzindo xaropes de glicose e frutose e na indústria de pães (Oudjeriouat et al. 2003). São utilizadas também na remoção de manchas de roupas e louças (Nielsen & Borchert, 2000) e na indústria têxtil (Igarashi et al. 1998).

Muitos microrganismos, especialmente do gênero *Bacillus* produzem amilases neutras ou ácidas, com pH em torno 6.5. Esta neutralidade é inútil, pois o raio de ação dos detergentes é entre pH 8-11 (Hagihara et al. 2001; Igarashi et al. 1998). Nos últimos anos foram descobertas α -amilases de *Bacillus* termoestáveis e fortemente ativas em meio alcalino, essas enzimas têm sido isoladas, descritas e utilizadas em vários processos em escala industrial (Haki & Rakshit, 2003; Horikoshi, 1999). Muito se tem feito para otimizar as enzimas, várias α -amilases tem sido construídas por técnicas de bioengenharia (Nielsen & Borchert, 2000).

Muitas enzimas extracelulares são obtidas à partir de bactérias do gênero *Bacillus*, bactérias de parede celular Gram positivas, estrutura que facilita a secreção de proteínas para o meio extracelular, pois a ausência de uma membrana externa simplifica as vias de secreção de proteínas. Conseqüentemente, *Bacillus* e gêneros aparentados têm um alto potencial de secreção de proteínas diretamente no meio de cultura, em altas concentrações (Stepheson & Harwood, 1998).

2.5 Controle Microbiológico

Controle microbiológico consiste no uso de um microrganismo vivo para eliminar ou controlar outro microrganismo (Von der Weid et al. 2003), oferece uma

alternativa ou se torna um ótimo suplemento ao uso de pesticidas químicos, diminuindo a carga de poluentes liberada no meio ambiente (Silo-Suh et al. 1994; Budi et al. 2000). Há vários mecanismos que contribuem para a atividade biocontroladora e conseqüente supressão dos patógenos, como competição por nutrientes e por sítios de colonização (Von der Weid et al. 2003). Muitas vezes o biocontrole é atribuída à antibiose. Em muitos estudos feitos, um ou mais antibióticos são produzidos que tem papel importante na supressão de doenças, minimizando o surgimento de resistência entre os patógenos por duas razões, a maioria dos agentes biocontroladores produz mais de um antibiótico, sendo que a resistência a múltiplos antibióticos ocorre somente em uma freqüência muito baixa e porque não é toda população de patógenos que é exposta (Handelsman & Stabb, 1996; Emmert & Handelsman, 1999). É vantajoso também porque há uma alta especificidade dos agentes utilizados, diminuindo a ocorrência de resistência aos agentes. Mesmo pertencendo a mesma espécie, diferentes isolados agem de diferentes maneiras e em diferentes estágios de desenvolvimento do organismo alvo (Walker, Powel & Seddon, 1998). O biocontrole pode ainda exercer um efeito mais duradouro que os pesticidas químicos, devido à complexidade das interações entre os organismos, ao número de mecanismos envolvidos na supressão da doença por um único microrganismo e da adaptabilidade deste ao ambiente onde será utilizado (Emmert & Handelsman, 1999).

Muitos microrganismos com atividade biocontroladora já foram identificados e a maioria são bactérias gram negativas, como *Pseudomonas* (Nielsen et al. 1998; Asaka & Shoda, 1996). O gênero *Bacillus* e mais recentemente o gênero *Paenibacillus*, têm sido estudados e comprovados para a

atividade de biocontroladores (Nielsen & Sorensen, 1997; Dijksterhuis et al. 1999). *Bacillus* e *Paenibacillus* spp compartilham várias características que os fazem bons candidatos a agentes biocontroladores, como abundância no solo, produção de vários metabólitos de amplo espectro de atuação (Kim, Cook & Weller, 1997) ativos biologicamente que agem sinergisticamente com enzimas extracelulares que degradam a parede celular de fungos (Mavingui & Heulin, 1994) e a habilidade de formar endósporos de resistência (Silo-Suh et al. 1994), uma forma estável, resistente à dessecação, calor, raios uv e solventes orgânicos (Walker, Powel & Seddon, 1998). São também habitantes do solo, epífitos ou endófitos nas rizosferas (Handelsman et al. 1990), são de fácil manejo, características vantajosas que os tornam candidatos ao uso como biocontroladores de doenças (Walker, Powell & Seddon, 1998; Asaka & Shoda, 1996).

Estudos realizados confirmaram o bom potencial biocontrolador de *Paenibacillus*, pois sua presença se mostrou eficaz no biocontrole de fungos fitopatógenos, além de ser compatível com a permanência de micorrizas, que tem papel principal na saúde e sobrevivência da planta (Budi et al. 1999). Além dos estudos *in vitro*, existem vários trabalhos que mostram a alta atividade antimicrobiana supressora de doenças das espécies do gênero *Bacillus in vivo*, como na supressão de doenças causadas por fungos em abóbora (*Cucumis sativus*) (Smith, Havey & Handelsman, 1993), em folhas de amoreira, alimento único do bicho da seda (Yoshida et al. 2001) e no trigo (Kim, Cook & Weller, 1997).

O gênero *Bacillus* tem sido bastante estudado quanto à sua ação como biocontrolador (Kim, Cook & Weller, 1997; Yoshida et al. 2001). Embora haja

estudos com *Paenibacillus*, estes ainda são pouco abrangentes, por isso é importante pesquisar as atividades antimicrobianas e seu potencial biocontrolador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura e reagentes

Todos os meios de cultura, soluções e reagentes utilizados na parte experimental dessa dissertação estão escritos no Apêndice 8.

3.2. Cepas utilizadas

Os isolados de amostras de água utilizados no presente trabalho pertencem à coleção do Departamento de Microbiologia/ICBS/UFRGS. Os isolados estão conservados em glicerol 15% a -20°C. As 55 cepas de 15 espécies do gênero *Paenibacillus* de água e solo (Tabela 1) foram isoladas anteriormente e identificadas por amplificação do 16S rDNA (primer específico para o gênero) e provas bioquímicas (Silveira, 2003).

3.3. Padronização da curva de desenvolvimento e de esporos

Em frascos Erlenmeyers com 100mL de caldo TSB (Merck) foram inoculados 100µL do pré-inoculo contendo uma cultura de *Paenibacillus* com 18 horas de incubação a 30°C. Esses frascos foram incubados a 30°C com agitação de 100rpm por 96 horas e foram retiradas alíquotas de 100µL de 24 em 24 horas, para fazer a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. Neste procedimento, uma alíquota de 100µL foi diluída de 10^{-1} a 10^{-7} em água peptonada 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e 20µL das últimas quatro diluições foram semeadas em triplicata em placas de ágar TSA (Merck). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

Tabela 1. Espécies de *Paenibacillus* isolados de amostras de água e de solo.

Espécie	Isolados de água* n= 33	Isolados de solo** n=22
<i>P. validus</i>	8	3
<i>P. alginolyticus</i>	0	4
<i>P. azotofixans</i>	6	3
<i>P. chibensis</i>	3	2
<i>P. glucanolyticus</i>	3	2
<i>P. illinoiesis</i>	3	0
<i>P. koreensis</i>	2	0
<i>P. brasilensis</i>	2	0
<i>P. borealis</i>	2	0
<i>P. thiaminolyticus</i>	1	2
<i>P. mascerans</i>	1	0
<i>P. pabuli</i>	1	3
<i>P. apiarius</i>	1	1
<i>P. macquariensis</i>	0	1
<i>P. peoriae</i>	0	1

Para fazer a contagem de esporos, retirou-se uma alíquota de 2 mL do crescimento em caldo descrito acima, no mesmo momento em que é feita a contagem de células vegetativas. Essa alíquota foi incubada em banho-maria por 10 minutos a 80°C para que as células vegetativas sejam eliminadas. Posteriormente, foram diluídas em água peptonada 0,1% e semeadas as quatro últimas diluições em triplicata em placas de TSA e incubadas a 30°C por 24 horas. As colônias contadas em placa serão originadas dos esporos.

* Amostras de água provenientes do Estuário Guaíba (Lami, Belém Novo e Ipanema).

** Amostras de solo provenientes de culturas de milho.

3.4 Determinação da Atividade Antibacteriana

Para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizadas 16 bactérias indicadoras Gram-positivas, Gram-negativas, cepas de referencia de patógenos de animais e plantas isolados de campo. Para determinação da atividade antifúngica dos isolados de *Paenibacillus* foram utilizados como indicadores, 14 cepas de fungos filamentosos e 6 cepas de leveduras de referência, isolados de campo e isolados clínicos. Os microrganismos e condições de crescimento podem ser visualizados na tabela 2.

3.4.1 Triagem dos isolados produtores de substâncias antibacterianas

Em placas de TSA os isolados de *Paenibacillus* foram inoculados em sulco e foram incubados a 30°C nos tempos de 24 horas, 36 horas e 48 horas, a fim de se determinar em qual dos tempos de incubação o isolado testado teria maior atividade antimicrobiana. Ao fim do tempo de incubação, as

Tabela 2: Bactérias indicadoras e condições de crescimento.

BACTÉRIAS INDICADORAS	Fonte*	Condições de crescimento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	BHI, 37°C.
<i>P. putida</i>	ATCC 15175	BHI, 37°C.
<i>P. fluorescens</i>	ATCC 13525	BHI, 37°C.
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 23355	BHI, 37°C.
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 1759	BHI, 37°C.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 23229	BHI, 37°C.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12692	BHI, 37°C.
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	BHI, 37°C.
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	BHI, 37°C.
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	ATCC 8718	BHI, 37°C.
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	BHI, 37°C.
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112	BHI, 37°C.
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	BHI, 37°C.
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	FA, UFRGS ^a	BHI, 37°C.
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	FA, UFRGS ^a	BHI, 37°C.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	FA, UFRGS ^a	BHI, 37°C.
FUNGOS FILAMENTOSOS		
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	PDA, 30°C.
<i>A. oryzae</i>	ATCC 1003	PDA, 30°C.
<i>A. fumigatus</i>	ATCC 16913	PDA, 30°C.
<i>Fusarium solani</i>	ATCC 36031	PDA, 30°C.
<i>Bipolaris oryzae</i>	ICBS/UFRGS ^b	PDA, 30°C.
<i>Bipolaris sorokiniana</i> 31	ICBS/UFRGS ^b	PDA, 30°C.
<i>B. sorokiniana</i> 32	ICBS/UFRGS ^b	PDA, 30°C.
<i>B. sorokiniana</i> 17	ICBS/UFRGS ^b	PDA, 30°C.
<i>B. sorokiniana</i> 19	ICBS/UFRGS ^b	PDA, 30°C.
<i>B. sorokiniana</i> 23	ICBS/UFRGS ^b	PDA, 30°C.
<i>Cladosporium</i> spp 0-19	ICTA/ UFRGS ^c	PDA, 30°C.
<i>Phoma</i> spp 0-21	ICTA/ UFRGS ^c	PDA, 30°C.
<i>Fusarium</i> spp 0-14	ICTA/ UFRGS ^c	PDA, 30°C.
<i>Verticillium</i> spp 0-13	ICTA/ UFRGS ^c	PDA, 30°C.
LEVEDURAS		
<i>Candida albicans</i> 1	ICBS/UFRGS ^d	SABOURAUD, 25°C.
<i>C. tropicalis</i> 2	ICBS/UFRGS ^d	SABOURAUD, 25°C.
<i>C. parapsilopsis</i> 1	ICBS/UFRGS ^d	SABOURAUD, 25°C.
<i>C. glabrata</i> L 30	ATCC 2001 ^e	SABOURAUD, 25°C.
<i>C. guilliermondii</i> L 31	NRRLY-2075 ^e	SABOURAUD, 25°C.
<i>C. tropicalis</i> L 33	NRRLY-12968 ^e	SABOURAUD, 25°C.

***a**- Cepas isoladas de batatas, Faculdade de Agronomia, UFRGS; **b**-Cepas isoladas de trigo, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; **c**- Cepas isoladas do arroz, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UFRGS; **d**-Cepas isoladas de pacientes com HIV positivo, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; **e**- Cepas tipo.

bactérias indicadoras foram semeadas em estrias perpendiculares ao inóculo da cepa de *Paenibacillus*, e incubadas a 37°C a fim de permitir o crescimento da indicadora e a verificação da presença de zonas de inibição, que foram medidas em milímetros. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.5 Determinação da atividade antifúngica

3.5.1 Preparação da suspensão de esporos fúngicos

O fungo indicador a ser testado foi crescido em placa de Agar Dextrose Batata (BDA - Acumedia) por 7 a 10 dias até que o crescimento atingisse as bordas da placa. Após esse tempo de incubação, 5mL de uma solução salina 0,85% era depositada sobre o crescimento e com um suabe estéril era feita uma raspagem suave para que os esporos se soltassem. Com uma micropipeta era retirada a solução salina com os esporos e essa solução foi ajustada para uma concentração de 10^4 esporos/ mL através de contagem em Câmara de Neubauer.

3.5.2 Triagem dos isolados produtores de substâncias antifúngicas

3.5.2.1 Fungos filamentosos

Foram inoculados 20 μ L da suspensão de esporos, aproximadamente 2×10^2 esporos, no centro de uma placa de ágar BDA previamente semeada com quatro isolados de *Paenibacillus* a 4 centímetros do centro. Essas placas foram incubadas a 30°C por 7 a 10 dias até que o crescimento do controle (placa

semeada somente com o fungo) atingisse as bordas da placa. Após esse tempo de incubação era verificada a presença ou não de zonas de inibição que eram medidas em milímetros. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.5.2.2 Leveduras

Em placas de Agar Sabouraud, isolados de *Paenibacillus* foram inoculados em sulco e incubados a 30°C por 48 horas. Ao fim do tempo de incubação, as leveduras indicadoras foram semeadas em estrias perpendiculares ao *Paenibacillus*, e incubadas a 25°C a fim de permitir o crescimento da indicadora e a verificação da presença de zonas de inibição, que foram medidas em milímetros. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.6 Atividade Antimicrobiana do sobrenadante de Cultura

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana do sobrenadante da cultura, 30µL de uma suspensão de células de 24 horas de crescimento a 30°C em caldo TSB foram inoculados em frascos contendo 30mL de caldo BHI Tamponado e incubado por 72 horas a 30°C (Piuri, Rivaz & Ruzal, 1998). Após o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada por 20 minutos a 5000g e o sobrenadante filtrado em membrana 0,22µm. Após a filtração o sobrenadante foi armazenado em microtubos e congelado a -20°C. Foram realizados testes para a confirmação da presença de atividade antibiótica no sobrenadante das culturas de isolados que mais se destacaram na triagem, oito isolados de *P. validus* (172, 112, 10M, 191, 111, 168, 40 e 4), quatro de *P. chibensis* (17b, 23, 12 e 18), um de *P. koreensis* (32M), um *P. pabuli* (24M), um *P.*

brasiliensis (16), um *P. illinoiensis* (23M) e o isolado de *P. peoriae* (57), para isso foi utilizado o método de difusão em poços. Os testes foram repetidos com as bactérias, fungos filamentosos e leveduras indicadoras e em duplicata.

3.7 Quantificação da Atividade Antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram realizadas diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) dos sobrenadantes das culturas em tampão PBS. Essas diluições foram inoculadas pelo método de difusão em poços, sendo que a determinação da atividade antimicrobiana (UA) mL⁻¹ foi definida como a maior diluição que apresentou halo de inibição de 2 mm de diâmetro.

3.8 Produção de enzimas extracelulares

3.8.1. Substratos testados

Para a determinação de isolados produtores de enzimas extracelulares, nove substratos foram testados, xilana, quitina, pectina, proteína (caseína), xantana, celulose, lipídeo, amido neutro pH 7 e alcalino pH 10. Todos os meios utilizados foram autoclavados por 15 minutos a 121°C.

3.8.2 Triagem para os isolados produtores de enzimas extracelulares

3.8.2.1 Xilanase

Para a triagem de isolados produtores de xilanases, foi utilizado um meio base suplementado com 0,4% de xilana, como única fonte de carbono, segundo Blanco e Pastor, 1993.

Meio: Na ₂ HPO ₄	6g/L
KH ₂ PO ₄	3g/L
NaCl.....	0,5g/L
1M MgSO ₄	1mL/L
1M CaCl ₂	1mL/L
Extrato de levedura.....	1g/L
Uréia.....	2,5g/L
Xilana.....	4g/L
Ágar.....	15g/L

Uma cultura de 18 horas foi semeada em estria em placas suplementadas com xilana e incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse tempo de incubação eram visualizados halos de degradação ao redor do crescimento.

3.8.2.2 Pectinase

Para a triagem de isolados produtores de pectinase, foi utilizado meio suplementado com 2% de pectina, como única fonte de carbono, segundo Cao, Zheng & Chen, 1992.

Meio: Pectina.....	20g/L
Extrato de levedura.....	1g/L
K ₂ HPO ₄	1g/L
MgSO ₄	0,5g/L
ZnSO ₄	0,01g/L
FeSO ₄	0,01g/L
KCl.....	0,5g/L
NaNO ₃	3g/L
Ágar.....	15g/L

O meio foi diluído em água destilada, ajustado em pH 7, adicionado ágar e autoclavado por 15 minutos a 121°C. NaNO₃ foi autoclavado separadamente e adicionado após resfriamento. Uma cultura nova incubada por 18 horas de crescimento em caldo TSB de *Paenibacillus* foi inoculada em estria em placas contendo meio para pectinase e foi incubada a 37°C por 72 horas. Após esse tempo de incubação foi verificada a presença ou não de zonas de degradação ao redor das colônias.

3.8.2.3 Lipase

Para a triagem de isolados produtores de lipases, foi utilizado um meio de cultura suplementado com 2,5% óleo de oliva, segundo Kouker & Jaeger, 1987, modificado.

Meio: Agar nutriente.....	23g/L
NaCl.....	4g/L
Ágar.....	15g/L

Óleo de oliva.....2,5%

Dissolver em água destilada, autoclavar, resfriar a 60°C e adicionar 25mL/L de óleo de oliva estéril e 10mL /L de solução de Rodamina B (Lynth) 0,001%. Uma cultura de 18 horas de *Paenibacillus* incubada em caldo TSB foi inoculada em picada em placas contendo meio para lipase. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Como controle positivo foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 13892, como controle negativo, *Escherichia coli* ATCC 23229. Após o tempo de incubação as placas foram observadas em transiluminador de luz ultravioleta a 350nm. Os isolados produtores de lipases apresentaram halo laranja fluorescente ao redor das colônias.

3.8.2.4 Amilase ativa em pH 7

Para a triagem de isolados produtores de amilase, foi utilizado um meio de cultura suplementado 1% de amido solúvel, segundo Mc Faddin, 1999.

Meio: Peptona..... 5g/L
Extrato de carne..... 3g/L
NaCl..... 5g/L
Amido solúvel..... 10g/L
Ágar..... 15g/L

Dissolver em água destilada, ajustar para pH 7 e autoclavar. Uma cultura de 18 horas de crescimento de *Paenibacillus* incubada em caldo TSB foi inoculada em picada em placas contendo meio para amilase. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A leitura e interpretação foi feita adicionando-se

uma solução de iodo 0,1% sobre as placas, os isolados que apresentaram halo claro ao redor das colônias foram considerados positivos para a produção de amilase ativa em pH neutro.

3.8.2.5 Amilase ativa em pH 10

Para a triagem de isolados produtores de amilase ativa em pH alcalino, foi utilizado um meio de cultura suplementado 1% de amido solúvel, segundo Mc Faddin, 1999 modificado.

Meio: Peptona.....	5g/L
Extrato de carne.....	3g/L
NaCl.....	5g/L
Amido solúvel.....	10g/L
Ágar.....	15g/L

Dissolver em água destilada e ajustar o pH para 10 e esterilizar. Uma cultura de 18 horas de *Paenibacillus* incubada em caldo TSB foi inoculada em picada em placas contendo meio para amilase. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A leitura foi feita adicionando-se uma solução de iodo sobre as placas, os isolados que apresentaram halo claro ao redor das colônias foram considerados positivos para a produção de amilase alcalina.

3.8.2.6 Protease

Para a triagem de isolados produtores de protease, foi utilizado um meio de cultura contendo 10% de leite em pó desnatado, segundo Budi et al. 2000.

Meio: Leite em pó desnatado.....	100g/L
Extrato de levedura.....	1,5g/L
Ágar.....	15g/L

O leite em pó foi autoclavado separadamente e adicionado após resfriamento. Uma cultura de 18 horas em caldo TSB de *Paenibacillus* foi inoculada em estria em placas contendo meio para protease e foi incubada a 37°C por 48 horas. Após esse tempo de incubação foi verificada a presença ou não de zonas de degradação ao redor das colônias.

3.8.2.7 Celulase

Para a triagem de isolados produtores de celulase, foi utilizado um meio contendo 1% de carboximetilcelulose, segundo Singh, Batra & Sobti, 2004.

Meio: Carboximetil celulose.....	10g/L
Peptona.....	5g/L
Extrato de levedura.....	5g/L
NaCl.....	5g/L
KH ₂ PO ₄	1g/L
Ágar.....	15g/L

Uma cultura de 18 horas em caldo TSB de *Paenibacillus* foi inoculada em picada em placas contendo meio para celulase e foi incubada a 37°C por 48 horas. A leitura foi feita adicionando-se solução de vermelho Congo 5% sobre as placas, os isolados que apresentaram halo claro ao redor das colônias após algumas horas, foram considerados positivos para a produção de celulase.

3.8.2.8 Atividade Xantanolítica

Para a triagem de isolados produtores de xantanase, foi utilizado meio de cultura mínimo contendo 0,2% de xantano.

Meio: Fosfato amônio dihidrogênio.....	1g/L
Fosfato dipotássico.....	1g/L
NaCl.....	5g/L
Goma xantana.....	2g/L
Sulfato de Magnésio.....	0,2g/L
Ágar.....	20g/L

Uma cultura de 18 horas de *Paenibacillus* foi inoculada em picada em placas contendo meio para xantanase e foi incubada a 37°C por 72 horas. A leitura foi feita adicionando-se solução de vermelho Congo sobre as placas, os isolados que apresentaram halo claro ao redor das colônias após algumas horas, foram considerados positivos para a produção de xantanase.

3.8.2.9 Quitinase

Para a triagem de isolados produtores de quitinases, o sobrenadante das culturas a serem testadas foi preparado. Alíquotas do crescimento de 18 horas de *Paenibacillus* foram inoculadas em frascos contendo 40 mL de meio YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado com 1% de pó de casca de crustáceo (casca de siri macerado manualmente em Gral e peneirado). Esses frascos eram incubados em estufa com agitação de 100rpm por 48 horas a 30°C. Após esse tempo de incubação, as culturas eram centrifugadas por 20 minutos a 5000G e o

sobrenadante filtrado em membrana milipore 0,22µm. Após a filtração, foram aplicados 30 µL do sobrenadante em placas contendo quitina pura a 0,2%, e ágar, essas placas foram incubadas por 16 horas a 37°C e foi observada a presença de halos de degradação após a adição do corante Vermelho Congo 1% (WATANABE et al, 1990)

Meio Líquido: YNB (Difco).....	0,67%
Extrato de levedura.....	0,5%
Pó de casca de crustáceo.....	1%
Meio sólido: Quitina purificada (Sigma).....	0,2%
Agar.....	2%

3.9 Testes em tubérculo de batata *in vivo*

3.9.1 Microrganismos patogênicos utilizados

Para os testes *in vivo*, foram utilizados quatro microrganismos fitopatógenos, as bactérias *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilensis*, causadoras da canela preta e podridão mole em batatas, *Ralstonia solanacearum*, que causa a murcha bacteriana em batatas e o fungo filamentoso *Fusarium solani* ATCC 36031, causador da podridão seca em tubérculos de batatas.

3.9.2 Preparação da cultura de Células e Esporos de *Paenibacillus*

Em frascos Erlenmeyers com 50mL de caldo TSB foram inoculados 50µL do pré-inóculo contendo uma cultura de *Paenibacillus* com 18 horas de

crescimento. Esses frascos foram incubados a 30°C com agitação de 100rpm por 24 horas após o tempo de incubação, alíquotas de 2mL foram retiradas. Posteriormente, os frascos foram devolvidos à estufa com agitação e a cultura incubada por mais 48 horas, a fim de assegurar a produção de esporos (10^6 esporos por mL). Após 72 horas de incubação, outra alíquota de 2mL foi retirada e incubada por 10 minutos em banho-maria a 80°C para a eliminação das células vegetativas. Após 10 minutos, a suspensão era aplicada nos testes *in vivo*.

3.9.3 Aplicação *in vivo*

3.9.3.1 Utilização da cultura de células, esporos e do sobrenadante livre de células na proteção de tubérculos de batata.

Para verificar a capacidade da cultura de células de *Paenibacillus* evitar a podridão mole, canela preta, murcha bacteriana e podridão seca, tubérculos de batatas foram perfurados com palito estéril, e 20µL da cultura de células de *Paenibacillus* contendo 10^7 UFC/mL, foram aplicados. Após 30 minutos, foi aplicada uma suspensão de 10^6 UFC/mL em solução salina das bactérias indicadoras a serem testadas e no caso do fungo filamentososo, uma suspensão de 10^4 esporos/mL do fungo indicador *Fusarium solani* nos mesmos locais onde foi aplicada a cultura de células de *Paenibacillus* (Mari, Guizzardi & Pratella, 1996).

As batatas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas a 25°C, após o tempo de incubação, foram cortadas na altura das lesões e fotografadas. Foram utilizadas batatas da variedade Mona Lisa, adquiridas no comércio local.

Para testar a capacidade dos esporos de *Paenibacillus* em evitar lesões em tubérculos de batatas, foi repetido o processo realizado com a cultura de células utilizando a suspensão de esporos.

Para testar a capacidade do sobrenadante da cultura em evitar a podridão mole, canela preta, murcha bacteriana e podridão seca em tubérculos de batatas, foi repetido o processo realizado com a cultura de células, utilizando o sobrenadante livre de células.

3.10 Análise Estatística

Para os testes de atividade antibacteriana foi realizado a análise da variância, para medidas repetidas (ANOVA). Para as análises de atividade antifúngica foram utilizados os testes não paramétricos Kruskal-wallis e Mann Whitney.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização da Curva de Crescimento e Esporos

Os isolados de *Paenibacillus* testados nesse trabalho foram escolhidos devido a comprovada atividade antagonista que esse gênero apresenta frente a um amplo espectro de microrganismos causadores de doenças em animais e plantas economicamente importantes (Seldin et al. 1999; Beatty e Jensen, 2002; Von der Weid et al. 2003). Peptídeos antibióticos são produzidos por muitas espécies de microrganismos incluindo bactérias Gram-positivas. Muitos desses metabólitos são produzidos sob condições de “stress” nutricional e o acúmulo destas substâncias pode ser observado em culturas na fase estacionária (Martin e Demain, 1980), no caso de *Paenibacillus* após 24 horas de incubação. Estudos preliminares mostram que a atividade antibiótica também pode estar relacionada à esporulação, que tem início na fase estacionária de desenvolvimento (Beatty e Jensen, 2002). Curvas de crescimento de células vegetativas e esporos foram feitas para três isolados de *Paenibacillus*. A Figura 1 demonstra a existência de

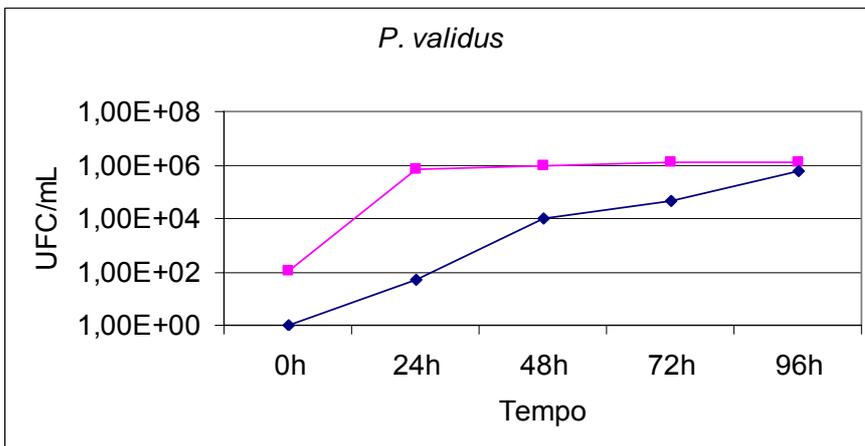
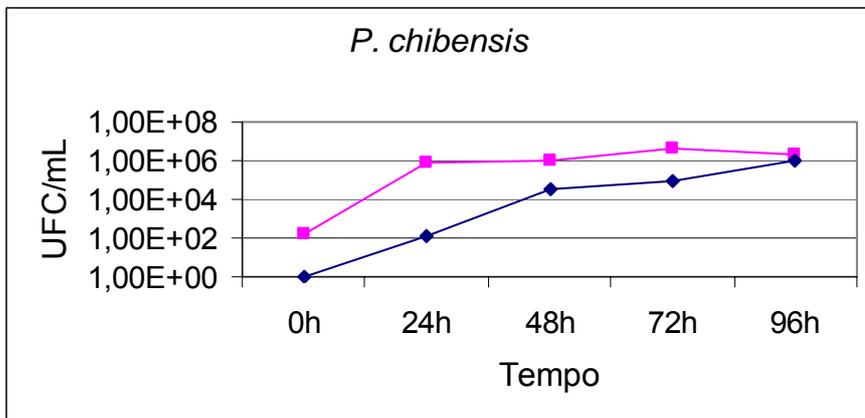
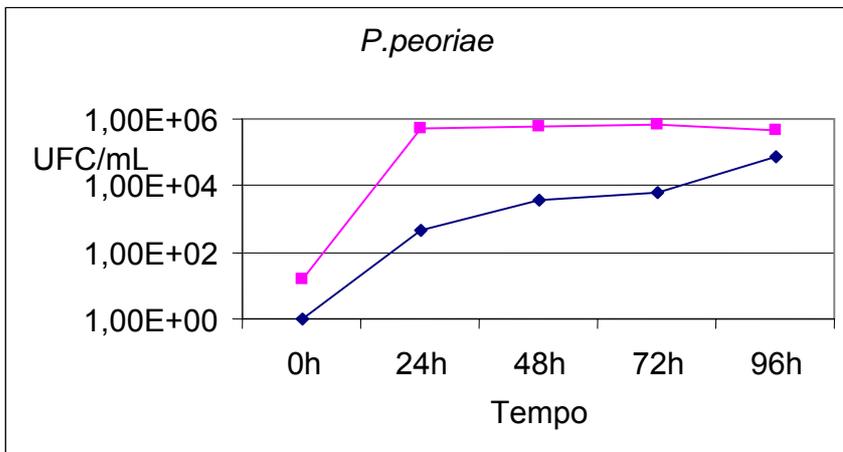


FIGURA 1: Curvas de Crescimento de três isolados de *Paenibacillus peoriae* (57), *P. chibensis* (17b) e *P. validus* (10M). Células vegetativas (---) e esporos (-♦-).

um padrão, onde todos os isolados testados alcançaram a fase estacionária e iniciaram a produção de esporos por volta de 24 horas de incubação. O número de esporos atingiu seu máximo por volta de 96 horas de incubação em dois dos isolados analisados, quando se iguala ao número de células vegetativas. Este fato sugere que quando a cultura atinge 96 horas, as células vegetativas não estão mais presentes, pois o crescimento bacteriano diminui devido ao aumento de metabólitos tóxicos e exaustão dos nutrientes, restando apenas as formas de resistência. A determinação deste período (fase estacionária) é importante, uma vez que antibióticos são metabólitos secundários e os microrganismos em geral iniciam a produção de tais compostos e esporos quando entram na fase estacionária de desenvolvimento.

4.2 Determinação da Atividade Antibacteriana

Todos os isolados de 15 espécies de *Paenibacillus* foram testados frente a 16 bactérias indicadoras Gram-positivas, Gram-negativas, cepas de referência patógenas de animais e plantas e isolados de campo (Tabela 1). Dos 55 isolados testados, 24 inibiram pelo menos uma bactéria indicadora em pelo menos um dos tempos (Tabelas 3 e 4). Dez isolados de seis espécies, *P. chibensis* (17b e 12), *P. koreensis* (32M), *P. illinoiensis* (23M), *P. validus* (112, 10M, 191), *P. pabuli* (24M) e *P. peoriae* (57) sobressaíram se inibindo pelo menos 14 das 16 bactérias indicadoras em pelo menos um dos tempos testados (Tabelas 3 e 4).

TABELA 3: Atividade antibacteriana de cepas de *Paenibacillus* spp isolados de solo frente a 16 bactérias indicadoras

ISOLADOS DE SOLO		<i>P. aer.</i>	<i>P. put</i>	<i>E. cloa</i>	<i>B. cep</i>	<i>S. son</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>Xanth</i>	<i>Pecto. c. c*</i>	<i>L. mono</i>	<i>P. fluor</i>	<i>R. sol</i>	<i>Pecto c. b **</i>	<i>S. typh</i>
44 <i>P. validus</i>	24h	-	+	+	+	++	-	+	-	+	++	-	-	+	-	-	-
	36h	-	-	+	-	+++	-	+	-	-	++	-	-	+	-	-	-
	48h	-	-	++	-	+++	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-
40 <i>P. validus</i>	24h	-	-	-	-	++	++	++	-	++	+	+++	+++	++	-	++	-
	36h	-	-	-	-	++	++	++	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	48h	-	-	-	-	++	++	++	-	++	+	-	-	+	-	-	-
4 <i>P. validus</i>	24h	-	-	-	-	-	+	+	-	++	++	+	++	-	-	-	-
	36h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	48h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
12 <i>p. chibensis</i>	24h	-	+	++	++	++	+++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	36h	-	+	+	+	-	-	-	++	-	++	++	+++	+++	+++	+++	++
	48h	-	+	++	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	-	-	-	-
43 <i>P. azotofixans</i>	24h	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	36h	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34 <i>P. azotofixans</i>	24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	36h	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	48h	-	-	-	+	-	+	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-
45 <i>P. azotofixans</i>	24h	-	-	-	-	+++	+++	++	-	++	-	++	+++	+	-	-	-
	36h	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	48h	-	-	-	-	++	+++	++	-	++	-	-	++	+	-	-	-
57 <i>p. peoriae</i>	24h	-	++	++	++	++	++	+++	+	++	++	+	-	-	-	++	-
	36h	-	+	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
	48h	-	++	+++	++	+++	+	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+	+

* *Pectobacterium carotovorum* subesp. *carotovorum*

** *Pectobacterium carotovorum* subesp. *brasiliensis*

P. aer.: *Pseudomonas aeruginosa*; *P. put.*: *P. putida*; *E. cloa.*: *E. cloacae*; *S. son.*: *Shigella sonnei*; *Xanth.*: *Xanthomonas anaxopodis*; *L. mono.*: *Listeria monocytogenes*; *P. fluor.*: *P. fluorescens*; *R. sol.*: *Ralstonia solanacearum*; *S. typh.*:

(-) não houve inibição (+) média do diâmetro das zonas de inibição: 5 a 11mm; (++) : 12 a 18 mm; (+++) 19 a 25mm.

TABELA 4: Atividade antibacteriana de cepas de *Paenibacillus* spp isolados do água frente a 16 bactérias indicadoras

ISOLADOS DE ÁGUA		<i>P. aer.</i>	<i>P. put</i>	<i>E. cloa</i>	<i>B. cep</i>	<i>S. son</i>	<i>S. aur</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>Xanth</i>	<i>Pecto. c. c.*</i>	<i>L. mono</i>	<i>P. fluor</i>	<i>R. sol</i>	<i>Pecto c. b.**</i>	<i>S. typh</i>	
41N	<i>P. validus</i>	24h	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
		36h	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		48h	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
172	<i>P. validus</i>	24h	-	+	++	+	-	+	-	-	+	+	-	+	++	++	+++	
		36h	-	+	++	+	-	+++	+++	-	-	+++	++	-	++	++	++	++
		48h	-	-	+	-	+	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
112	<i>P. validus</i>	24h	-	+	++	-	-	+	++	++	-	+	-	++	++	+	+	
		36h	-	-	++	-	-	++	++	++	+++	++	++	-	++	++	++	+
		48h	-	+	++	+	++	+++	++	+	+++	++	++	-	+	++	++	+
10M	<i>P. validus</i>	24h	-	+	+++	-	++	-	++	+	++	+	+++	++	++	+++	++	
		36h	-	+	-	++	++	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
		48h	-	+	++	+	++	-	++	+	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-
191	<i>P. validus</i>	24h	-	-	++	-	-	+	++	+	++	+	++	++	+	++	+	
		36h	-	++	-	++	++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	++	++	++	+
		48h	-	+	++	+	++	++	++	+	+++	++	+++	+++	+++	+	-	-
111	<i>P. validus</i>	24h	-	+	+	+	+	-	++	-	-	+	-	++	++	+++	++	
		36h	-	++	+++	++	+++	-	++	-	-	-	++	-	++	++	+++	-
		48h	-	++	+	++	++	-	+++	-	-	+	+	-	++	+	++	+
168	<i>P. validus</i>	24h	-	++	+++	-	++	-	++	-	-	++	-	++	+	++	+	
		36h	-	++	++	+++	++	++	+++	-	-	-	+++	-	+++	++	++	+
		48h	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	++	-	+++	++
169	<i>P. validus</i>	24h	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	
		36h	-	-	-	-	-	+	-	+	+++	++	-	-	-	-	-	
		48h	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	
189	<i>P. azotofixans</i>	24h	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		36h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		48h	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
23	<i>P. chibensis</i>	24h	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++	++	++	-	+++	++	
		36h	-	-	-	-	-	+	++	-	++	++	++	++	++	++	-	
		48h	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	+++	+	-	-	-	-	
17b	<i>P. chibensis</i>	24h	-	+	-	-	+	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	
		36h	-	+	-	++	+	+	+	-	++	+++	+	-	++	-	-	
		48h	-	+	+	+	++	-	++	-	++	+++	++	-	++	++	++	
24M	<i>P. pabuli</i>	24h	-	+	-	-	+	-	-	+	+	++	+++	+++	++	++	-	
		36h	-	-	-	-	+	++	-	-	+	+	+++	+++	++	++	++	
		48h	-	++	+	++	++	++	++	-	+++	++	+++	+++	+++	++	++	
11	<i>P. glucanolyticus</i>	24h	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		36h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	
		48h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	
29	<i>P. illinoensis</i>	24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	
		36h	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		48h	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23M	<i>P. illinoensis</i>	24h	-	+	+	-	-	-	-	++	++	++	+	++	++	+++	++	
		36h	-	+	+	-	-	++	-	+	++	++	++	+	++	++	+++	
		48h	-	+	++	+	+	-	-	+	++	++	+	+	++	++	++	
32M	<i>P. koreensis</i>	24h	-	+	++	-	++	-	++	+	++	+	++	+	++	++	++	
		36h	-	+	++	++	++	-	++	++	+++	+++	++	-	+	-	++	
		48h	-	+	++	+	++	-	++	+	+++	++	++	-	++	++	++	
16	<i>P. brasiliensis</i>	24h	-	-	-	-	+	+	-	-	-	++	+	++	++	+++	++	
		36h	-	-	-	-	+	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	
		48h	-	-	-	+	++	++	++	+	+++	+++	++	++	++	++	+++	

* *Pectobacterium carotovorum* subesp. *carotovorum*; ** *Pectobacterium carotovorum* subesp. *brasiliensis*

(-) não houve inibição (+) média do diâmetro das zonas de inibição: 5 a 11mm; (++) 12 a 18 mm; (+++) 19 a 25mm.

P. aer.: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. put.*: *P. putida*; *E. cloa.*: *E. cloacae*; *S. son.*: *Shigella sonnei*, *Xanth.*: *Xanthomonas anaxopodis*; *L. mono.*: *Listeria monocytogenes*; *P. fluor.*: *P. fluorescens*; *R. sol.*: *Ralstonia solanacearum*; *S. typh.*: *S.*

A indicadora *Pseudomonas aeruginosa* não foi susceptível a nenhum isolado de *Paenibacillus*. *P. aeruginosa* é uma bactéria patogênica oportunista que se caracteriza pela resistência inata a vários antibióticos (multirresistência intrínseca), atribuída a baixa permeabilidade da membrana externa desses microrganismos, tendo como fator contribuinte um processo de efluxo de antibióticos (Bianco, Neshat e Poole, 1998). As médias das zonas de inibição variaram de 5 a 25mm de acordo com o isolado. O crescimento de *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii* e *Salmonella typhimurium* foi pouco inibido, com médias das zonas de inibição entre 5 e 18 mm, o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *L. innocua* foram fortemente inibidos com médias maiores de 19mm. FOLDES et al (2000) realizou a triagem de uma cepa de *Bacillus* sp. IFS-01, frente a bactérias patogênicas e obteve leve redução do crescimento de *Pseudomonas* spp, *Xanthomonas campestris*, *E. coli* e *Salmonella* spp. No entanto o crescimento de *S.aureus* e *Listeria monocytogenes* foi inibido. Esses resultados vêm ao encontro dos resultados do presente estudo.

P. chibensis (n=5) apresentou boa ação antibiótica, já que 4 isolados inibiram a maioria das indicadoras, com as médias das zonas de inibição variando entre 9 e 25mm. A cepa *P. koreensis* (32M) também se destacou apresentando amplo espectro de atuação, inibindo 14 das 16 indicadoras testadas. A cepa *P. peoriae*, com apenas um isolado, conseguiu inibir o crescimento de 15 das 16 bactérias indicadoras. Von der weid et al. (2003) realizou triagem com um isolado de *P. peoriae* NRRL BD-62 frente a *E.coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subesp. *carotovora* e *Burkholderia cepacia* entre outras bactérias, encontrando resultados semelhantes ao deste estudo, isto é, as cepas bacterianas citadas tiveram seu crescimento inibido por *Paenibacillus*. As espécies *P. glucanoliticus*, *P. thiaminolyticus*, *P. borealis*, *P. alginolyticus* e *P. apiarius* não apresentaram qualquer efeito

antibiótico sobre as indicadoras em qualquer um dos três tempos, resultado não significativo devido ao pequeno número de isolados testados (Figura 3). Girardin et al. (2002) observaram uma forte ação antibiótica de *Paenibacillus polymyxa* contra cepas de *Clostridium botulinum* isolados de alimentos. Piuri, Rivaz e Ruzal (1998) e Seldin et al. (1999) testaram cepas de *Paenibacillus* contra várias bactérias indicadoras, obtendo um amplo espectro de inibição, com exceção de *P. aeruginosa*, que não foi inibida, como apresentado neste estudo.



FIGURA 2: Efeito inibitório de *Paenibacillus P. validus* (isolado 10M) nas estrias verticais contra as bactérias indicadoras *Xanthomonas axonopodis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* nas estrias horizontais.

De maneira geral, bactérias de estrutura Gram positiva e Gram negativa foram susceptíveis, dentre elas *Pectobacterium carotovorum* subesp. *carotovorum* que foi inibida por 20 isolados, seguida de *Xanthomonas anoxopodis*, *S. aureus*, e *P. fluorescens* que tiveram seu crescimento inibido por 19 isolados. Dentre as indicadoras que menos sofreram inibição, estão *C. freundii* que foi susceptível a apenas 11 isolados, seguida de *P. putida*, *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *L. monocytogenes* e *R. solanacearum*, susceptíveis a 14 isolados.

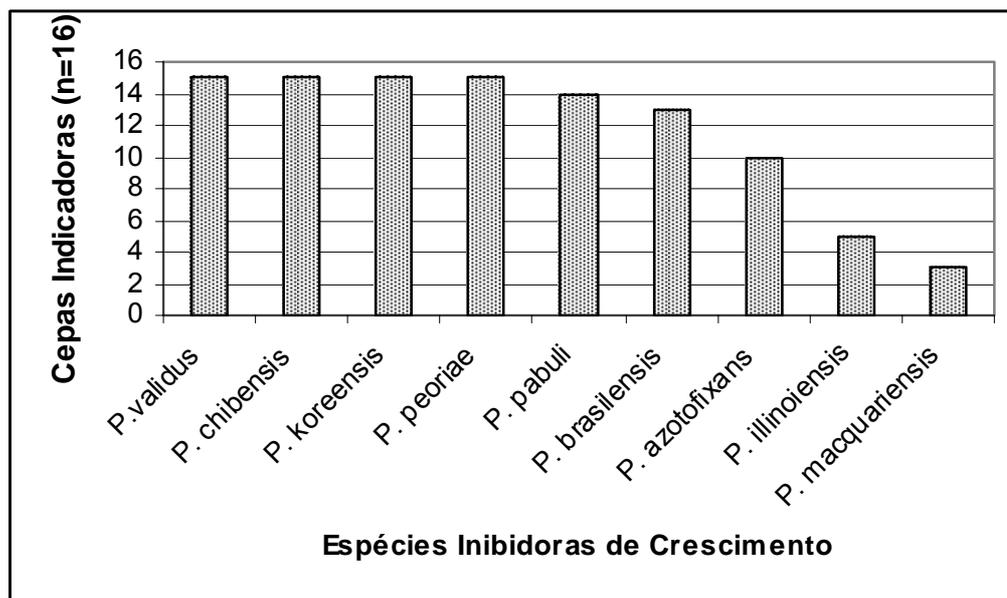


FIGURA 3: Padrão de Inibição de cepas indicadoras pelas espécies de *Paenibacillus* que apresentaram alguma atividade inibitória

Após análise estatística (ANOVA) foi possível afirmar que houve interação entre o tempo de incubação e a cepa indicadora, isto é, a diferença entre os tempos é significativa para os isolados de amostra de água, mostrando que dependendo da indicadora o melhor tempo de incubação é acima de 36 horas. Isto se dá possivelmente pela fase em que a cultura se encontra, pois entre 36hs e 48hs a cultura esta na fase estacionária média a tardia, quando a concentração de metabólitos secundários se encontra em níveis elevados (Figura 1). Piuri, Rivaz e Ruzal (1998) realizaram curvas de produção com *Paenibacillus polymyxa* demonstrando que a atividade antibiótica máxima se dá por volta de 30 horas, permanecendo nesse nível até 80 horas de incubação. Para os isolados de amostra de solo não houve diferença significativa entre os três tempos, indicando que 24h de incubação seria tempo suficiente para a obtenção de uma boa atividade antibiótica pois nesse período, a cultura já se encontra numa fase estacionária precoce, com considerável produção de metabólitos ativos.

4.3 Determinação da Atividade Antifúngica

Entre os 55 isolados, apenas 18 (32%) apresentaram atividade antifúngica, com as médias das zonas de inibição variando entre 13 e 32mm. As espécies *P. validus* e *P. chibensis* se destacaram, pois 9 dos 11 isolados de *P. validus* e quatro dos cinco de *P. chibensis* apresentaram atividade antifúngica (Tabela 5).

O isolado 57, único da espécie *P. peoriae*, apresentou boa ação inibitória, diminuindo o crescimento de 13 fungos testados. Na figura 4 é possível observar claramente o isolado (*P. peoriae*) que apresentou atividade inibitória frente ao indicador, pois as demais cepas de *Paenibacillus* aparecem cobertas pelo crescimento do fungo. Os isolados 191, 10M, 112, 172 da espécie *P. validus*, 17b e 23 da espécie *P. chibensis*, 23M *P. illinoiensis* e 16 *P. brasilensis* também se mostraram ativos frente aos indicadores, segundo a Tabela 5. Von der weid et al. (2003) realizou triagem semelhante de uma cepa de *P. peoriae* NRRL BD-62 frente a 14 fungos fitopatogênicos entre eles o gênero *Fusarium*, encontrando resultado semelhante ao deste estudo, de 14 cepas de fungos testados, 12 foram inibidos pelo *Paenibacillus*. Nielsen e Sorensen (1997) também realizaram uma triagem com cepas de *P. polymyxa*, obtendo como resultado a inibição de cepas de 3 fungos fitopatogênicos importantes.

TABELA 5: Atividade antifúngica de cepas de *Paenibacillus* frente a cepas indicadoras de fungos filamentosos

ESPECIE	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>F. solani</i>	<i>B. oryzae</i>	0-13*	0-19*	0-14*	0-21*	<i>Bipolaris sorokiniana</i>					
										98017	98023	98031	98032	019/92	
ISOLADOS DE ÁGUA															
191	<i>P. validus</i>	++	++	+++	+++	+++	+	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
10m	<i>P. validus</i>	++	++	+	++	+++	+	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++
169	<i>P. validus</i>	+	-	-	-	+	-	++	+	+	+	-	-	-	-
112	<i>P. validus</i>	+	+	++	++	++	+	++	++	+	++	+++	+++	+++	+++
172	<i>P. validus</i>	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+	+	+++	+++	+++	+++	++
168	<i>P. validus</i>	+	++	++	++	+++	+	++	+	+	+++	++	+++	+++	-
111	<i>P. validus</i>	+	-	+	++	+	+	+	-	++	+++	++	++	++	+++
26	<i>P. azotofixans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
204	<i>P. azotofixans</i>	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	++	+
17b	<i>P. chibensis</i>	+++	++	++	+++	+++	+	++	+	++	+++	+++	++	+++	+++
23	<i>P. chibensis</i>	+	++	++	++	++	+	+	++	+	+++	+++	++	+++	+++
19	<i>P. glucanolyticus</i>	++	++	++	-	+++	+	++	+	+	+++	++	++	+++	+++
23M	<i>P. illinoensis</i>	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+++	++	+++	+++	+++
32M	<i>P. koreensis</i>	-	+++	++	+	++	+	++	++	+	+++	++	+	+++	+++
16	<i>P. brasiliensis</i>	++	++	++	++	+++	+	+++	+	+	+++	+++	+	+++	+++
29M	<i>P. macerans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
ISOLADOS DE SOLO															
40	<i>P. validus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	++	++	++	+
4	<i>P. validus</i>	+++	+++	+++	+++	-	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
33	<i>P. alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	++	++	++	-	-	-	-	-
37	<i>P. alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-
38	<i>P. glucanolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	-	++	+	-	-	-	-	-
12	<i>P. chibensis</i>	++	+++	+++	+++	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++
18	<i>P. chibensis</i>	+++	++	++	++	+	+	+	++	++	+++	-	-	+++	++
57	<i>P. peoriae</i>	+	+	++	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++

médias dos diâmetros das zonas de inibição: (+) 13 a 20mm; (++) 21 a 25mm, (+++)26 a 32mm; (-) não houve inibição

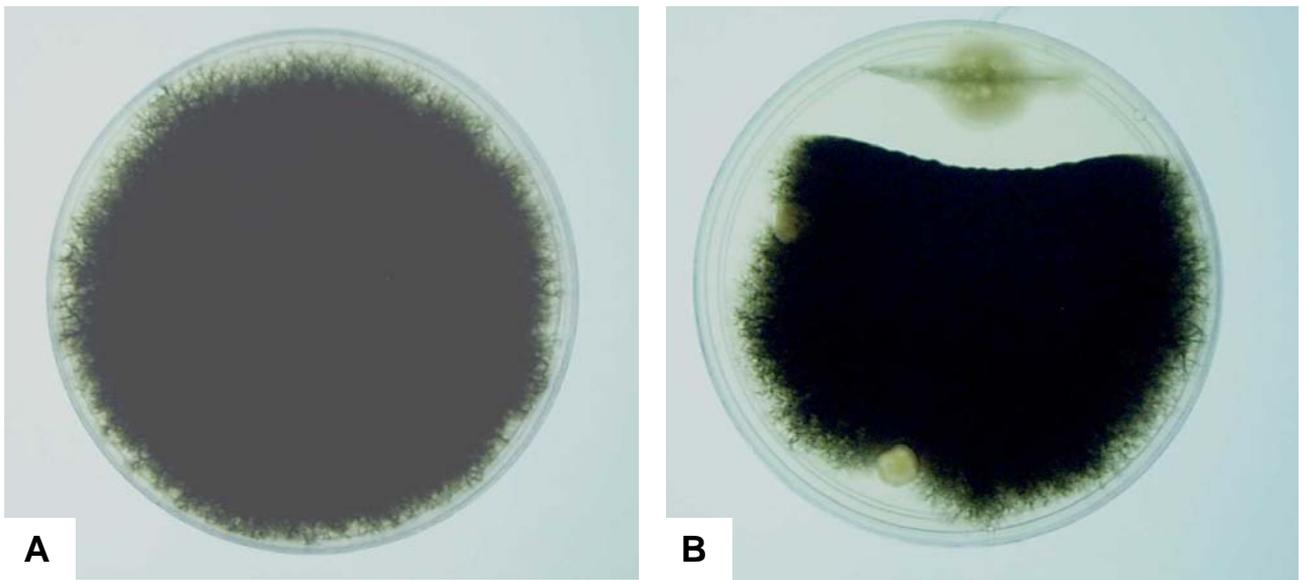


FIGURA 4: Efeito inibitório de *P. peoriae* sobre o fungo *Bipolaris sorokiniana*. A) controle do crescimento da cepa de *B. sorokiniana* 019/92 após 10 dias de crescimento. B) Inibição da cepa de *B. sorokiniana* 019/92 por *P. peoriae*, isolado 57, após 10 dias de crescimento.

Após análise estatística, pelo teste não paramétrico Kruskal-wallis podemos constatar que houve diferença significativa em pelo menos dois grupos provenientes de amostras de água, o grupo de isolados 172, 191, 17b, 10m, 16, 23m, 23, 112, 168, 19, 32m e 111 não apresentou diferença significativa entre si, apresentando ação inibitória mais efetiva frente aos indicadores ($p < 0,05$). Para os isolados de amostras de solo, o grupo formado pelos isolados 4, 12, 18, 57, 40, 33

e 37 não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), e este grupo também apresentou ação mais efetiva frente aos indicadores do que o restante dos isolados. Utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney, é possível afirmar que os isolados obtidos das amostras de água apresentaram-se mais eficazes frente aos indicadores de que o grupo de isolados de amostras de solo ($p < 0,05$).

Apenas dez dos 55 testados (18%) foram efetivos frente às cepas de *Candida* spp de referência e isolados clínicos (Tabela 6). As cepas de *Paenibacillus* tiveram pouca ação inibitória contra leveduras, uma vez que estas foram inibidas por apenas, dois de amostra de solo e seis de amostra de água. A indicadora *C. guilliermondii* (L31) foi inibida apenas pelo isolado 57 (*P. peoriae*) sendo que este isolado foi o único a inibir o crescimento de todas as leveduras, com médias de zonas de inibição variando entre 12 e 20mm. Os demais isolados não inibiram as cepas de *Candida* spp (Tabela 6).

A diferença entre o grande número de fungos filamentosos indicadores inibidos e o pequeno número de leveduras susceptíveis aos mesmos isolados se deu provavelmente pela diferença na metodologia entre os testes com fungos filamentosos e leveduras. Os fungos e os isolados de *Paenibacillus* foram semeados no mesmo momento e cresceram juntos por 7 dias, estando presente na fase log de crescimento (< 24 horas), fase onde ocorre a produção de enzimas e o substrato estava presente para ser degradado (parede celular). No entanto, as cepas de leveduras foram semeadas depois da fase log de crescimento de cepas de *Paenibacillus*, após 48 horas de incubação, tempo em que já haveria a

degradação das enzimas produzidas. Esta hipótese explicaria a diferença caso as inibições tenham sido causadas por enzimas hidrolíticas.

A estrutura da parede de fungos em geral é composta por uma variedade de biopolímeros complexos como glicanas, mananas e quitina, e o arranjo dessas moléculas confere uma identidade individual a cada organismo. Dependendo do grupo taxonômico que pertence, cada fungo apresenta uma composição diferenciada de moléculas (Klis et al. 2002).

Seldin et al (1999) testou uma cepa de *P. polymyxa* frente a vários microrganismos patogênicos a humanos, entre eles *Candida albicans* isolada de paciente com mucocandidíase. Esta cepa foi inibida pelo isolado de *Paenibacillus*, resultado semelhante ao de nosso estudo, já que todas as cepas provenientes de isolados clínicos (*Candida albicans* 1, *C. parapsilopsis* 1 e *C. tropicalis* 2) foram susceptíveis às culturas de *Paenibacillus* (Tabela 6).

4.4 Atividade do Sobrenadante da Cultura

Após a triagem dos isolados produtores de substâncias com ação antibiótica, foram escolhidos 17 isolados (12 amostras provenientes de água e 5 de amostras de solo) que mais se destacaram inibindo grande parte dos microrganismos indicadores. Com esses isolados foi verificado se os sobrenadantes das culturas apresentavam atividade antibiótica. Foram produzidos

TABELA 6: Inibição de espécies de *Candida* spp por cepas de *Paenibacillus*

ESPÉCIE	<i>C. albicans</i> 1	<i>C. parapsilopsis</i> 2	<i>C. tropicalis</i> 2	L30	L31	L33
ISOLADOS DE ÁGUA						
191 <i>P. validus</i>	++	++	++	-	-	-
10M <i>P. validus</i>	++	++	++	+	-	-
168 <i>P. validus</i>	++	+	++	+++	-	-
17b <i>P. chibensis</i>	++	+	++	++	-	-
23 <i>P. chibensis</i>	++	-	-	-	-	-
19 <i>P. gluconolyticus</i>	++	++	++	++	-	-
23M <i>P. illinoiensis</i>	+++	++	+++	-	-	-
32M <i>P. koreensis</i>	++	-	-	++	-	-
ISOLADOS DE SOLO						
4 <i>P. validus</i>	++	+	+	-	-	+++
57 <i>P. peoriae</i>	+	+	+	+++	+	+++

- negativo; +média da zona de inibição até 12mm; ++ 13 a 15mm; +++ 16 a 20mm.

L30: *C. glabrata*; L31: *C. guilliermondii*, L33: *C. tropicali*

sobrenadantes de cultura à partir do crescimento de oito isolados de *P. validus* (172, 112, 10M, 191, 111, 168, 40 e 4), quatro de *P. chibensis* (17b, 23, 12 e 18), um de *P. koreensis* (32M), um *P. illinoiensis* (23M) um *P. pabuli* (24M), um *P. brasilensis* (16) e o isolado de *P. peoriae* (57). Todos os isolados produziram sobrenadantes com uma atividade antibiótica contra as bactérias indicadoras (Tabela 7 e Figura 5) com exceção de três isolados (24M, 18 e 57) que não produziram sobrenadantes ativos contra as bactérias. As indicadoras mais susceptíveis foram *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *X. anoxopodis*, *Shigella sonnei*, *Burkholderia cepacia*, *Pectobacterium carotovorum* e *Salmonella typhimurium* foram inibidas por no máximo 3 sobrenadantes. *S. aureus* foi inibido por 2 sobrenadantes. As indicadoras *E. Cloacae* e *C. freundii* não foram inibidas por nenhum sobrenadante. O único isolado de amostra de solo que produziu sobrenadante ativo foi o da espécie *P. chibensis* (12).

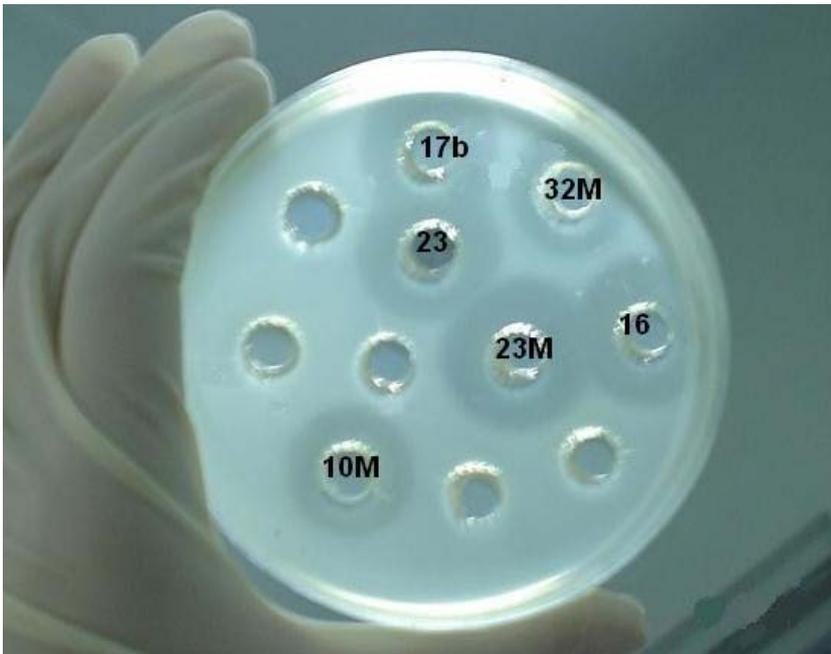


FIGURA 5: Halos de inibição dos sobrenadantes dos isolados de *P. chibensis* (17b, 23), *P. koreensis* (32M), *P. illinoiensis* (23M), *P. brasilensis* (16) e *P. validus* (10M) frente à bactéria indicadora *Listeria innocua*, em TSA.

Tabela 7: Isolados produtores de sobrenadantes ativos contra bactérias indicadoras

ESPECIES	<i>P. put</i>	<i>E.cloa.</i>	<i>B.cep</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>Xanth</i>	<i>L. mono</i>	<i>P. fluor</i>	<i>R. sol</i>	<i>Pecto.c.b</i>	<i>S. tiph</i>
ISOLADOS DE ÁGUA														
17b <i>P. chibensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
32M <i>P. koreensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
16 <i>P. brasiliensis</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
172 <i>P. validus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
23 <i>P. chibensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
112 <i>P. validus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
23M <i>P. illinoensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
10M <i>P. validus</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
191 <i>P. validus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
111 <i>P. validus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ISOLADOS DE SOLO														
12 <i>P. chibensis</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

P. put: *P. putida*; *E. cloa*: *E. cloacae*; *S.son*: *Shigella sonnei*, *Xanth*: *Xanthomonas*; *L. mono*: *Listeria monocytogenes*; *P. fluor*: *P. fluorescens*; *R. sol*: *Ralstonia solanacearum*; *S. tiph*: *S. tiphymurium*, *Pectoc.b*: *Pectobacterium carotovorum subesp. brasiliensis*.

(+) apresentou atividade; (-) não apresentou atividade

Todavia, seu sobrenadante de cultura não apresentou atividade antagonista. Semelhantes resultados foram também observados por Von der Weid et al. (2003), que analisou uma cepa de *P. peoriae* NRRL BD-62. No entanto, em nosso estudo, quando a célula foi retirada nos testes do sobrenadante, este se mostrou inativo. Von der Weid et al. (2003) encontrou atividade no sobrenadante extraído da cepa *P. peoriae* NRRL BD-62, nas mesmas condições de pH, temperatura e agitação que as relatadas neste estudo, a diferença ser devido a serem cepas diferentes ou pela diferença de substâncias produzidas pelos dois isolados nos dois estudos ou o meio de cultura, já que utilizamos TSB e no trabalho citado utilizou-se meio DM, composto de glicose, sais e aminoácidos. Smith, Harvey e Handelsman (1993) observaram que a atividade do *Bacillus* UW85 na redução da podridão em abóbora provocada por *Phytophthora* spp era maior quando havia presença de célula no meio.

BUDI et al 1999 observou que uma cepa de *Paenibacillus* e seus metabólitos suprimiram o crescimento micelial, produção de esporângio e alongação do tubo germinativo de *P. parasitica* um fungo fitopatogênico, isto é importante já que tais efeitos impedem que se complete o ciclo de vida do patógeno. Os resultados com fungos filamentosos indicaram uma ótima ação inibitória do isolado 23 (*P. chibensis*), cujo sobrenadante foi eficaz contra todos os fungos testados (Tabela 8). Os isolados 16, 10M e 168 apresentaram alguma ação antibiótica, inibindo o crescimento de parte dos fungos testados, com halos de inibição variando entre 4 e 9mm. O restante dos isolados não produziu sobrenadantes ativos contra os fungos. Curiosamente, nenhum dos isolados de

amostras de solo que anteriormente inibiram o crescimento, produziu sobrenadantes ativos contra fungos filamentosos. A atividade antibiótica presente no filtrado da cultura é devido à secreção de metabólitos da bactéria no meio de cultura. A atividade estava presente na maioria dos sobrenadantes testados, sugerindo que o antibiótico foi liberado para o meio. Os isolados restantes não apresentaram qualquer atividade quando a célula era retirada, sugerindo que a ação inibitória apresentada na triagem inicial pode ser devido aos metabólitos estarem ligados a membrana celular ou a produção de enzimas extracelulares, como quitinases, celulases, β -1,3 glucanases e proteases (Mavingui e Heulin, 1994; Budi et al. 2000). Nos testes com leveduras, destacam-se os isolados de *P. validus* 168, 10M e 4 que foram capazes de inibir o crescimento de cepas de *Cândida* spp provenientes de amostras clínicas (Tabela 9). Sobrepondo se o resultado da Tabela 6 e da Tabela 9 é possível verificar que a inibição apresentada pelos isolados 10M, 168 e 4 (*P. validus*) e 23 (*P. chibensis*) sobre as cepas de leveduras se deve provavelmente a produção de compostos antifúngicos e não por enzimas hidrolíticas, pois nos testes do sobrenadante a atividade inibitória se manteve. O sobrenadante foi produzido com 72 horas de incubação, se houvesse a produção de enzimas na fase log, até a fase estacionária tardia estas já teriam sido degradadas e utilizadas como nutriente (Figura 1). Esses compostos antifúngicos agiriam sobre as glicanas, quitinas e mananas presentes na parede celular ou sobre as enzimas responsáveis pela sua montagem, as sintases (Debono e Gordee, 1994).

TABELA 8: Isolados produtores de sobrenadantes ativos contra fungos filamentosos

AMOSTRAS DE ÁGUA	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>F. solani</i>	<i>Verticillium spp</i>
32M <i>P. koreensis</i>	-	+	-	+	-
16 <i>P. brasiliensis</i>	-	+	+	+	+
23 <i>P. chibensis</i>	+	+	+	+	+
23M <i>P. illinoiensis</i>	-	-	-	-	+
10M <i>P. validus</i>	-	+	-	+	+
168 <i>P. validus</i>	-	+	-	+	-

+ apresentou atividade; - não apresentou atividade

TABELA 9: Inibição de espécies de *Candida* pelo sobrenadante *Paenibacillus*

ISOLADOS	<i>C. albicans</i> 1	<i>C. parapsilopsis</i> 2	<i>C. tropicalis</i> 2	L30	L31	L33
17b <i>P.chibensis</i>	-	-	-	-	-	-
32M <i>P. koreensis</i>	-	-	-	-	-	-
23 <i>P.chibensis</i>	+	-	-	-	-	-
23M <i>P.illinoiensis</i>	-	-	-	-	-	-
10M <i>P.validus</i>	+	+	+	-	-	-
191 <i>P.validus</i>	-	-	-	-	-	-
168 <i>P. validus</i>	+	+	+	+	-	-
57 <i>P. peoriae</i>	-	-	-	-	-	-
4 <i>P. validus</i>	+	+	+	-	-	-

L 30: *Cândida glabrata*; L31: *C. guiliermondii*, L33: *C. tropicalis*

- não apresentou atividade inibitória, + apresentou atividade inibitória.

4.5 Detecção da Atividade Hidrolítica

No presente trabalho foi testada a presença de atividade hidrolítica de *Paenibacillus*, foram testados nove substratos: quitina, xilana, xantana, pectina, celulose, amido, lipídio e proteína (caseína). Os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 10 e 11.

As celulases, isoladas de uma variedade de organismos, têm recebido atenções como resultado de seu potencial na biodegradação da biomassa e produção de combustível (Gilkes et al. 1991). Cerca de 72% dos isolados (40) de *Paenibacillus* testados neste estudo foram produtores de celulases a partir da carboximetilcelulose (Figura 6), sendo que a maioria produtora teve origem nas amostras de água. Nielsen e Sorensen (1997) realizaram uma triagem para *Bacillus* e *Paenibacillus*, encontrando 75% de produtores, resultado que semelhante ao deste estudo.

As hemiceluloses são a segunda fonte de nutriente mais abundante disponível na natureza, sendo componente estrutural da parede celular de plantas, onde a xilana é das hemiceluloses (Kulkarni et al. 1999). Cerca de 47% (26 isolados) de *Paenibacillus* foram produtores de xilanases, (Figura 6). Nielsen e Sorensen (1997), testaram cepas de *Paenibacillus* e *Bacillus* quanto à produção de xilanases e obtiveram semelhante resultado.

Tabela 10: Perfil enzimático de cepas de *Paenibacillus* provenientes de amostras de água

ESPÉCIE	ISOLADO	XILANASE	PECTINASE	PROTEASE	XANTANASE	CELULASE	LIPASE	AMILASE pH 7	AMILASE pH 10	QUITINASE
<i>P. validus</i>	191	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. validus</i>	4IN	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>P. validus</i>	10M	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. validus</i>	169	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>P. validus</i>	112	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. validus</i>	172	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. validus</i>	168	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>P. validus</i>	111	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. azotofixans</i>	189	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>P. azotofixans</i>	39mar	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. azotofixans</i>	6	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>P. azotofixans</i>	26	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. azotofixans</i>	204	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. azotofixans</i>	32	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>P. chibensis</i>	17b	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. chibensis</i>	23	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. chibensis</i>	171	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. gluconolyticus</i>	11	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>P. gluconolyticus</i>	18	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>P. gluconolyticus</i>	19	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. illinoiensis</i>	29	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>P. illinoiensis</i>	23M	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. illinoiensis</i>	79	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. koreensis</i>	5	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. koreensis</i>	32M	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. brasiliensis</i>	21	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. brasiliensis</i>	16	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>P. borealis</i>	37	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. borealis</i>	125	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>P. thiaminolyticus</i>	AC	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. macerans</i>	29M	-	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>P. pabuli</i>	24M	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>P. apiarius</i>	28	-	-	+	-	+	-	+	+	-

Tabela 11: Perfil enzimático de cepas de *Paenibacillus* spp provenientes de amostras de solo

ESPÉCIE	ISOLADO	XILANASE	PECTINASE	PROTEASE	XANTANASE	CELULASE	LIPASE	AMILASE pH 7	AMILASE pH 10	QUITINASE
<i>P. validus</i>	40	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. validus</i>	4	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. validus</i>	44	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. azotofixans</i>	43	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. azotofixans</i>	34	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>P. azotofixans</i>	45	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>P. alginolyticus</i>	7	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>P. alginolyticus</i>	8	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>p. alginolyticus</i>	33	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>P. alginolyticus</i>	37	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. glunanalyticus</i>	38	+	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>P. glucanalyticus</i>	32	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. chibensis</i>	12	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>P. chibensis</i>	18	+	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>P. thiaminolyticus</i>	23	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>P. thiaminolyticus</i>	3	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. pabuli</i>	41	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>P. pabuli</i>	42	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. pabuli</i>	28	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>P. apiarius</i>	19	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>P. macquariensis</i>	21	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>P. peoriae</i>	57	+	-	-	+	-	-	+	-	-

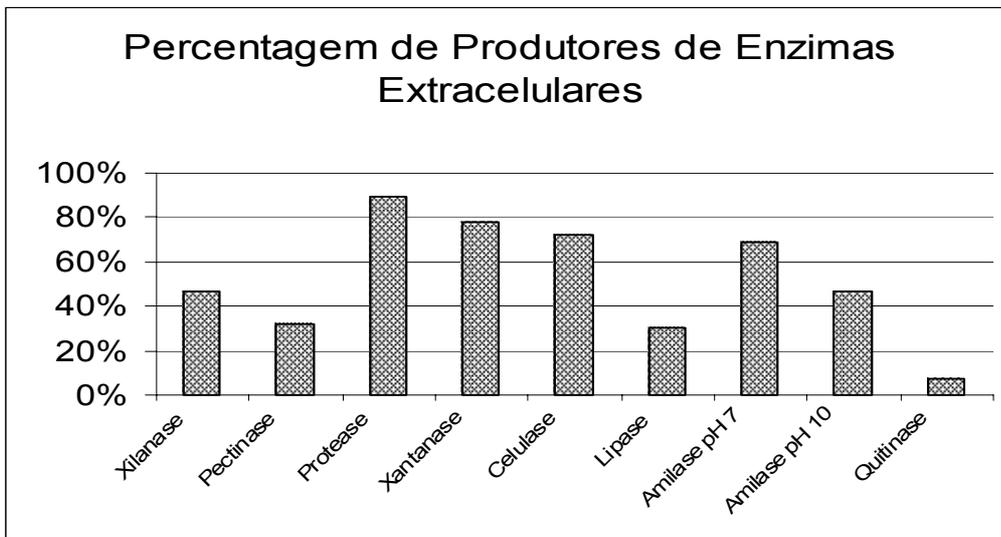


Figura 6: Percentagem do perfil enzimático de cepas de *Paenibacillus*

Neste estudo também testaram as mesmas cepas para produção de outras enzimas como celulase, caseinase e quitinase sendo que a maioria das cepas hidrolisou os substratos. No presente estudo, apenas cinco cepas foram produtoras de xilanases sem serem produtoras de celulases, apresentando-se com grande utilidade para a indústria do papel, uma vez que a ausência de celulase é imprescindível, já que as xilanases removem seletivamente os componentes da hemicelulose sem afetar a celulose (Subramanyan e Prema, 2000). Por outro lado, o uso em consórcio de celulases e xilanases nas dietas fornecidas a animais é comum na indústria de rações, aumentando o valor nutricional dos cereais e melhorando a digestibilidade animal (Bhat, 2000). No presente estudo 21 isolados (38%) foram produtores de ambas as enzimas (Tabelas 10 e 11) sendo ótimos candidatos para estudos e caracterização de xilanases e celulases utilizadas na indústria de rações.

A indústria do amido é uma das maiores consumidoras de enzimas hidrolíticas na modificação de substrato. O amido, por ser um polímero, requer uma combinação de enzimas para sua completa hidrólise e é comum a utilização de enzimas de origem microbiana como

fonte industrial de amilases (Haki e Rakshit, 2003). A produção de amilase ativa em pH neutro foi encontrada em 67% (37 isolados) dos *Paenibacillus* testados (Figura 6), e 25 isolados (45%) foram produtores de amilases em pH alcalino, 10,0. Amilases ativas em pH neutro não têm utilidade na indústria de detergentes, já que a faixa de ação dos detergentes em geral é pH 8,0 (Hagihara et al. 2001). A maioria das espécies de *Bacillus* é produtora de amilases neutras ou ácidas, daí a importância em se encontrar bactérias que produzem enzimas ativas em pH alcalino, em nosso estudo foi possível encontrar 10 das 15 espécies produtores de amilase em pH 10,0 (Tabelas 10 e 11). Kim et al (1995) isolou uma espécie de *Bacillus* de amostras de solo forte produtora de amilases altamente ativas em pH 10. Igarashi et al (1998), também encontraram *Bacillus* produtor de amilase ativa em pH 8,5.

Proteases microbianas estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes e têm sido estudadas extensivamente. Há várias proteases bacterianas no mercado sendo bastante utilizadas, a grande maioria é proveniente de cepas de *Bacillus* (Gupta, Beg e Lorenz, 2002). A atividade proteolítica dos isolados de *Paenibacillus* foi avaliada em meio ágar leite (caseinase) resultando em 89% de isolados produtores (49 de 55 testados) (Figura 6). Semelhante resultado foi encontrado por Rojas-Avelipaza, 1999, onde 90% dos 152 isolados de *B. thuringiensis* foi capaz de produzir protease (caseinase). A produção de proteases na grande maioria dos isolados deve-se provavelmente à grande importância desse grupo de enzimas na hidrólise de proteínas livres do meio, o que habilita a célula bacteriana absorver e utilizar os produtos dessa hidrólise. Devido a relativa facilidade no isolamento de cepas de *Bacillus* de diversas fontes, esses organismos têm se tornado o foco das atenções na biotecnologia (Haki e Rakshit, 2003).

Microrganismos produtores de amilases, proteases e xilanases vêm sendo utilizados como fonte de complexos multienzimáticos para rações animais (Blanco et al. 1995). Dezesesseis

isolados se enquadram nesse perfil, cinco isolados da espécie *P. validus*, quatro *P. chibensis*, dois *P. glucanolyticus*, um *P. koreensis*, um *P. brasilensis*, um, *P. illinoiensis*, um *P. azotofixans* e um *P. algynolyticus*, esses isolados são ótimos candidatos a serem explorados na indústria de beneficiamento de rações (Tabelas 10 e 11).

Um grande número de lipases tem sido produzido comercialmente sendo que a maioria delas é originária de fungos e bactérias (Jaeger e Reetz, 1998). Poucas cepas testadas nesse trabalho foram lipolíticas, apenas 17 dos 55 testados (cerca de 30%). A secreção de lipases por cepas bacterianas dá indícios de virulência, como *S. aureus* e *Pseudomonas* spp, potentes produtores de lipases quando estão infectando um paciente (Stehr et al. 2003). No entanto, não há registros de patogenicidade em cepas de *Paenibacillus*, que provavelmente se utilizam dessas enzimas apenas como meio de obtenção de nutrientes. Várias espécies de *Bacillus* são conhecidas como sendo a maior fonte de enzimas lipolíticas para uso industrial (Haki e Rakshit, 2003). No entanto, o gênero *Paenibacillus* não se mostrou bom produtor de lipases neste estudo, apesar pertencerem a mesma família e possuírem características e aplicações tão semelhantes. A busca incessante por novos microrganismos produtores tanto de lipases quanto de outras enzimas de interesse deve-se a fatores limitantes como altos custos e falta de enzimas que sejam ativas numa faixa de especificidade catalítica, propriedades que são requeridas nas mais diversas aplicações (Sharma, Chisti e Banerjee, 2001).

A quitina e seus derivados possuem alto valor econômico devido as suas versáteis características biológicas e aplicações na agricultura (SAKAI et al. 1998). Apenas 4 isolados (7%) de *Paenibacillus* foram produtores de quitinases, sendo das espécies *P. chibensis* (12), *P. koreensis* (32M), *P. azotofixans* (43) e *P. thiaminolyticus* (23). Poucos isolados produtores foram encontrados também por Rojas-Avelipaza, 1999, com 19% das cepas de *Bacillus thuringiensis*

produtoras. Os autores também notaram que quando as cepas cresciam em meio com casca de crustáceo, produziam quantidades mínimas de quitinases, apenas 2 UQ/mL, em comparação com a cepa de referência *Serratia marcescens* WF que produzia 40 UQ/mL da enzima.

Provavelmente o número reduzido de isolados produtores no presente estudo deve-se a pouca quantidade de enzima que não foi capaz de ser detectada pelo método utilizado. A triagem iniciou-se pelo método direto, ou seja, semeadura dos isolados em placa contendo quitina purificada. Os resultados foram todos negativos. Num segundo passo, foi testada a incubação prévia dos isolados em um caldo YNB enriquecido com pó de casca de crustáceo por 48 horas a 30°C em tubos de ensaio, antes de ser semeado em placas contendo quitina purificada, novamente os resultados foram negativos. Numa terceira tentativa, foi produzido o sobrenadante das culturas dos isolados crescidos em meio YNB enriquecido com pó de casca de crustáceo, em estufa com agitação a 30°C por 48 horas. O filtrado foi incubado em placas com quitina purificada por 18 horas. Com essa metodologia foram obtidos 4 isolados positivos em 55 testados, provavelmente esses 4 isolados produziram quantidades maiores de quitinases, que puderam ser detectados pelo método do Vermelho Congo.

A degradação da quitina acontece em 2 etapas. Uma endoquitinase reduz o tamanho do polímero, em oligômeros e uma exoquitinase subseqüentemente os degrada em monômeros (Sakai et al. 1998). Barboza e Corona et al. 1999 testaram 100 cepas de *B. turingiensis* e selecionaram apenas 3 produtoras de quitina sob diferentes condições de pH. Essa espécie de *Bacillus* foi escolhida no intuito de utilizar sinergisticamente a quitina e a endotoxina (conhecida por sua ação inseticida), já que essa enzima é importante na solubilização e ativação da endotoxina. Pleban, Chernin e Chet (1997) encontraram atividade quitinolítica em cepas de *Bacillus cereus* somente após 96 horas de incubação.

As pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas no âmbito doméstico. Sua aplicação comercial iniciou por volta da década de 30, na preparação de vinhos e sucos de frutas. Atualmente é uma das mais utilizadas no setor comercial (Kashiap et al. 2001). Em nosso trabalho, 32% (17) dos isolados testados foram produtores de pectinases. Tamburini et al. (2003) realizaram uma triagem semelhante, encontrando 16% de isolados pectinolíticos, sendo que a grande maioria desses isolados pertence ao gênero *Bacillus*. Sakiyama et al (2001) isolou uma cepa endofítica de *Paenibacillus amyloolyticus* a partir de frutos do café que se mostrou um potente produtor de pectinases com apenas 0,3% de pectina como indutor e fonte de carbono. Kobayashi et al (2001) numa triagem em amostras de solo, também isolou uma cepa de *Bacillus* spp que apresentou forte atividade pectinolítica.

Cao, Zheng e Chen (1992) testaram 84 isolados e apenas quatro foram produtores de pectinases e xilanases, todos do gênero *Bacillus*. Esse trabalho foi realizado com o intuito de descobrir novas cepas bacterianas que possam ser utilizadas no amaciamento de fibras naturais (que são compostas originalmente por pectina, hemicelulose e celulose). Sendo assim, é necessário que as cepas sejam produtoras de pectinases e xilanases, mas não celulasas, para que a tenacidade das fibras seja mantida. Nesse contexto, apenas o isolado 12 *P. chibensis* se enquadraria nas condições para maiores estudos e posterior utilização no beneficiamento de fibras naturais. Atualmente, a indústria de processos de amaciamento de fibras tem necessidade de aumentar a velocidade dos processos, aumentando a qualidade da fibra com redução de custos (Tamburini et al. 2003), daí a importância na descoberta de novas cepas que possam melhorar a qualidade dos processos industriais gerando produtos de melhor qualidade.

Enzimas com atividade xantanolítica tem importantes aplicações na indústria de polímeros. Em nosso estudo, 78% dos isolados foram produtores dessas enzimas, sendo que

desses, 91% dos isolados de solo foram produtores. Cadmus (1982) isolou duas cepas de *Bacillus* spp do solo, que foram produtores de enzimas com atividade xantanolítica. Quando essas cepas cresciam em consórcio, a produção era maior do que quando cresciam isoladamente. Ruijsenaars (1999) encontrou uma cepa de *Paenibacillus alginolyticus* capaz de produzir xantana liase entre outras enzimas que degradam a xantana.

As culturas de células e as enzimas que degradam xantana podem também ser utilizadas no tratamento de infecções causadas por *Xanthomonas* (Hashimoto et al. 1998) nesse contexto, 19 isolados de *Paenibacillus*, *P. validus* (172, 112, 10M, 191, 169, 44, 40, 4), *P. chibensis* (17b, 12, 18, 23), *P. koreensis* (32M), *P. illinoiensis* (23M), *P. macquariensis* (21), *P. pabuli* (41, 42), *P. brasilensis* (16) e *P. peoriae* (57) deste estudo poderiam ser utilizados, uma vez que a bactéria *Xanthomonas anoxopodis* foi a indicadora mais inibida.

A cepa de *P. peoriae* 57 deste estudo não se mostrou bom produtor de enzimas extracelulares, secretando apenas três dos nove testados, sendo eles xilanase, xantanase e amilase ativa em pH 7. Von Der Weid et al. (2003) obteve produção de proteases e quitinases a partir da cepa *P. peoriae* NRRL BD-62.

Outro fato que merece destaque é a cepa 23 de *P. thiaminolyticus* que foi uma das poucas produtoras de quitinases mas não teve qualquer atividade inibitória frente aos fungos filamentosos e leveduras indicadoras, sugerindo que as inibições podem ser resultado da ação sinérgica entre enzimas e compostos antibióticos.

Microrganismos produtores de várias enzimas são mais desejáveis que produtores de uma enzima em particular, apresentando uma versatilidade maior na indústria, além de serem mais econômicos (Beilen e Li, 2002). Muitos isolados deste trabalho apresentam tal característica, já que foi detectada a produção de várias enzimas de interesse industrial, *P. validus* (191), degradou todos os substratos testados, com exceção da quitina, *P. koreensis*

(32M), foi capaz de degradar todos os substratos com exceção da pectina, o isolado *P. chibensis* (12) possui bom perfil a ser explorado pois é produtor de amilase alcalina, xilanase sem celulase (qualidade imprescindível para utilização na indústria do papel), protease, lipase e quitinase. Além da maioria dos isolados, que foram produtores de 4 ou mais enzimas, característica que também os tornam bons candidatos para utilização na indústria.

Steele e Stowes (1991) enfatizam que apesar dos avanços na genética e fisiologia microbiana estarem exercendo um enorme impacto na produção de enzimas, programas de triagem de novos microrganismos capazes de produzir moléculas bioativas ainda é uma importante ferramenta na biotecnologia. Nosso estudo revela claramente o potencial desse gênero, com os dados da tabela 8 e figura 6 mostrando a ocorrência de todas as enzimas de interesse.

4.6 Atividade antifúngica X Produção de Enzimas Hidrolíticas por *Paenibacillus*

Estratégias modernas de controle biológico têm como ponto fundamental o sinergismo entre antibióticos e enzimas que degradam a parede celular. *Bacillus* spp e espécies relacionadas são interessantes nesse contexto devido ao repertório amplo de antibióticos que produzidos juntamente com enzimas hidrolíticas, como as quitinases, associada ao antagonismo de *Paenibacillus polymyxa* contra fungos basidiomicéticos (Nielsen e Sorensen, 1997). Nesse contexto, é possível destacar a cepa 32M de *P. koreensis*, que obteve ação inibitória frente a pelo menos uma levedura e três fungos filamentosos patogênicos, sendo que também foi produtora de proteases, quitinases, celulasas e xilanases (Tabela 12). A cepas 17b (*P. chibensis*), 10M e 191 (*P. validus*) também se destacam por inibirem fungos filamentosos e pelo menos uma espécie de *Candida* spp e serem ainda produtores de proteases, celulasas e xilanases (Tabela 12).

Budi et al. (2000) realizou uma triagem semelhante e obteve uma cepa de *Paenibacillus* spp, isolada de amostra de solo, capaz de secretar 4 enzimas extracelulares (celulase, protease, quitinase e pectinase). Em adição, essa cepa foi capaz de inibir o crescimento fungos patogênicos importantes, como *P. parasítica* e *F. oxysporum*. *P. koreensis* é conhecido pela produção de compostos antifúngicos inibidores do crescimento de vários patógenos de plantas e animais, sendo que esta espécie é usada como controlador biológico de fungos devido à sua habilidade em degradar quitina (Chung et al.2000).

Tabela 12: Atividade antifúngica e produção de enzimas hidrolíticas por cepas de *Paenibacillus*

		Levedura	Fungos filamentosos			Enzimas hidrolíticas		
ESPÉCIE		<i>C. albicans</i> 1*	<i>F.solani</i> **	<i>B. oryzae</i> **	<i>B. sorokiniana</i> **	Protease	Celulase	Quitinase
ISOLADOS DE ÁGUA								
191	<i>P. validus</i>	++	+++	+++	+++	+	+	-
10m	<i>P. validus</i>	++	++	+++	+++	+	+	-
169	<i>P. validus</i>	-	-	+	-	+	+	-
112	<i>P. validus</i>	-	++	++	+++	+	+	-
172	<i>P. validus</i>	-	+++	+++	++	+	+	-
168	<i>P. validus</i>	++	++	+++	-	+	+	-
111	<i>P. validus</i>	-	++	+	+++	+	+	-
26	<i>P. azotofixans</i>	-	-	+	+	+	+	-
204	<i>P. azotofixans</i>	-	-	-	+	-	+	-
17b	<i>P. chibensis</i>	++	+++	+++	+++	+	+	-
23	<i>P. chibensis</i>	++	++	++	+++	+	+	-
19	<i>P. glucanolyticus</i>	++	-	+++	+++	+	+	-
23M	<i>P. illinoiensis</i>	+++	++	+	+++	+	+	-
32M	<i>P. koreensis</i>	++	+	++	+++	+	+	+
16	<i>P. brasiliensis</i>	-	++	+++	+++	+	+	-
ISOLADOS DE SOLO								
40	<i>P. validus</i>	-	-	+	+	-	-	-
4	<i>P. validus</i>	++	+++	-	+++	+	+	+
12	<i>P. chibensis</i>	-	+++	-	++	+	-	+
18	<i>P. chibensis</i>	-	++	+	++	+	-	-
57	<i>P. peoriae</i>	+	-	+	++	-	-	-

* Médias das zonas de inibição: + até 12mm; ++ 13 a 15mm; +++ 16 a 20mm; - negativo

** Médias das zonas de inibição: + 13 a 20mm; ++ 21 a 25mm; +++ 26 a 32mm; - negativo

Enzimas: + positivo, - negativo

As celulasas e enzimas relacionadas são também capazes de degradar a parede celular de certos fitopatógenos controlando doenças em plantas. A β -1,3 glucanase do fungo *Trichoderma* inibiu sinergisticamente a germinação dos esporos e alongação do tubo germinativo de *Botrytis cinerea*, um importante fungo patogênico (Lorito et al. 1994). Este é um fato importante, já que a maioria dos isolados de *Paenibacillus* apresentou ótima atividade antifúngica, que pode ser o resultado da ação de enzimas extracelulares como celulasas, proteases ou quitinases, do sinergismo entre essas enzimas ou da ação conjunta das enzimas e de peptídeos antimicrobianos.

4.7 Testes *in vivo* com tubérculos de batata

Dos 55 isolados de amostra de ambiente, 15 isolados inibiram *Pectobacterium carotovorum* subesp. *brasilensis*, 13 inibiram *Ralstonia solanacearum*, e 15 inibiram o crescimento de *Fusarium solani*. Esses microrganismos são fitopatogênicos, associados a lesões em tubérculos de batata. A partir desses isolados, fez-se uma triagem para as linhagens produtoras de enzimas pectinolíticas, já que a secreção dessas enzimas causa apodrecimento e conseqüentemente lesão nos tubérculos, sendo sua produção considerada fator de virulência em microrganismos fitopatógenos (Kobayashi et al. 2001). Para os testes *in vivo*, foram utilizados os isolados que inibiram os patógenos *in vitro* e desses, os não produtores de pectinases. Resultando em 15 isolados testados (17b, 32M, 16, 172, 23, 112, 23M, 10M, 191, 111, 168, 12, 18, 57 e 4).

Nos dos testes *in vivo* em tubérculos de batata (Figura 7), pode se observar a formação de lesões provocadas pelas cepas de *Paenibacillus* testadas, tanto nos testes a partir da cultura quanto da suspensão de esporos. Com esses resultados, testamos o sobrenadante da cultura desses mesmos isolados, já que são produtores de substâncias com atividade

antimicrobiana, e provavelmente a presença das células vegetativas e esporos contribui para a formação de lesões, possivelmente pela produção de outras enzimas. Foi realizada também a quantificação da atividade dos sobrenadantes que se mostraram ativos: 17b, 32M, 16, 172, 23, 112, 23M, 10M, 191, 111 e 12.

Os sobrenadantes das culturas não foram capazes de evitar a formação de lesões provocadas pelos patógenos testados, provavelmente pela pouca atividade dos mesmos (25 a 50 UA/mL). Estudos preliminares (Oliveira, 2003) mostram que somente o sobrenadante bruto não é capaz de controlar a formação de lesão nos tubérculos devido a pequena atividade, sendo imprescindível a purificação e concentração desse sobrenadante.

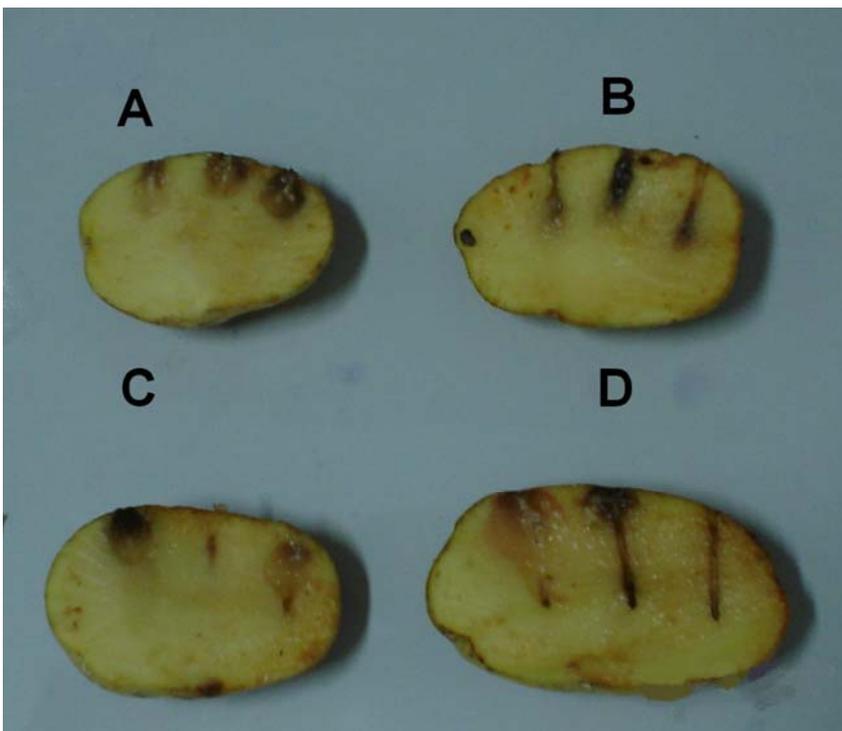


Figura 7: Lesões em tubérculos de batata provocadas por culturas de células de *Paenibacillus*. **A e C**: controles com as culturas de células dos isolados 10M e 191 respectivamente. **B e D**: tratamentos com as mesmas culturas de 10M e 191 e 106 células de *Pectobacterium carotovorum*

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Os isolados de *Paenibacillus* do presente estudo apresentaram um amplo espectro de inibição frente a fungos e bactérias. Na atividade antibacteriana, as espécies *P. chibensis*, *P. validus*, *P. koreensis* e *P. peoriae* foram as que se destacaram inibindo 93% das bactérias indicadoras testadas. Na atividade antifúngica, *P. peoriae* inibiu o crescimento de 92% dos fungos testados.

2. O gênero *Paenibacillus* é produtor de uma ampla gama de enzimas hidrolíticas de interesse industrial. Dos 55 isolados analisados, 47% apresentaram atividade xilanolítica, 30% pectinolítica, 89% proteolítica, 78% xantanolítica, 72% de celulolítica, 30% lipolítica, 67% de amilase ativa em pH 7,0, 45% de amilase ative em pH 10,0 e 7% apresentou atividade quitinolítica.

3. Os isolados foram também produtores de várias enzimas simultaneamente, apresentando um grande potencial a ser explorado em indústrias como a do papel e rações.

4. Quatro isolados (10M, 191, 17b e 32M) obtiveram os melhores perfis enzimáticos e podem ser utilizados como biocontroladores de fungos patogênicos, devido à produção

sinérgica de enzimas hidrolíticas e compostos antifúngicos. Com destaque ao isolado 32M que foi o único dos quatro a produzir quitinase.

5. A cultura de *Paenibacillus* e o sobrenadante bruto produzidos não foram efetivos para aplicação no controle de doenças provocadas por microrganismos.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para futuros estudos sobre o potencial biotecnológico das substâncias produzidas pelas bactérias do gênero *Paenibacillus* podemos citar:

- produzir novos sobrenadantes dos isolados que se destacaram e realizar sua caracterização bioquímica;
- estudar os mecanismos de ação das substâncias antifúngicas e antibacterianas;
- purificar as enzimas de interesse, para estudos de otimização de sua atividade;
- realizar testes de campo para verificar a repetibilidade dos resultados e realizar as adaptações necessárias para o uso comercial.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIPPI e AGUILAR. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* susp. *larvae* from diverse geographical origin by polymerase chain resction and BOX primers. **Journal of Invertebrate Pathology**.v. 72, p. 21-27, 1998.
- ASAKA, O. e SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off tomato *with Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4081-4085, Washington, 1996.
- ASH, C.; PRIEST, F.G. e COLLINS, M.C. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 253-260, 1993
- BAJPAI, P. Microbial Xylanolytic Enzyme System: properties and Application. **Advances in Applied Microbiology**, v. 43, p. 141-185, 1997.
- BARBOZA e CORONA et al. Selection of chitinolytic straind of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 1125-1129, 1999.
- BEATTY, P. e JENSEN, S. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaridicin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p.159-169, Ottawa, 2002.
- BEILEN, J.B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 338-344, 2002.
- BERGE et al. *Paenibacillus graminis* sp. nov., and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 607-616, 2002.

- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000
- BIANCO, N., NESHAT, S. e POOLE, K. Conservation of multidrug resistance efflux gene *oprM* em *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 853-856, 1998.
- BLANCO, A. e PASTOR, F.I.J. Characterization of cellulase free xylanases from the newly isolated *Bacillus* sp strain BP-23. **Canadian J. Microbiology**, v. 39, p. 1162-1166, Ottawa, 1993.
- BLANCO et al. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* spp. strain BP-23. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4468-4470, Washington, 1995.
- BOSSHARD, P.P.; ZBINDEN, R. e ALTWEGG, M. *Paenibacillus turicensis* sp. nov., a novel bacterium harbouring heterogeneities between 16s rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2241-2249, 2002.
- BUDI et al. Isolation from *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5148-5150, Washington, 1999.
- BUDI et al. Hydrolitic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 191-199, 2000.
- CADMUS et al. Biodegradation of Xanthan Gum by *Bacillus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 5-11, Washington, 1982.
- CAO, J.; ZHENG, L e CHEN, S. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potencial application in degumming of ramie. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 14, p. 1013-1016, 1992.
- CASULA, G. e CUTTING, S. *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrintestinal Tract. **Applied and Environment Microbiology**, v. 68, p. 2344-2352, Washington, 2002.
- CHRISTIANSEN, T. e NIELSEN, J. Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady state and transient continuos cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 265-273, 2002
- CHUNG et al. *Paenibacillus koreensis* sp.nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. **International Journal an Evolutionary Microbiology**. V. 50, p. 1495-1500, 2000.
- DAANE et al. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrating bacterium from rhizosphere of salt marsh

- plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 131-139, 2002.
- DASMAN et al. *Paenibacillus glycanolyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produce by the cyanobacterium *Nostoc commune*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1669-1674, 2003.
- DEBONO, M. e GORDEE, R. Antibiotics that inhibit fungal wall development. **Annual Reviews Microbiology**, v. 48, p. 471-497. 1994.
- DE LUCCA, A.J. e WALSH, T.J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against Emerging Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1-11, 1999.
- DIJKSTERHUIS et al. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 13-21, 1999.
- DUC LE, H. e CUTTING, S.M. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicle. **Expert Opinion in Biology Therapy**, v. 3, p. 1268-1270, 2003.
- DUC et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for humen use. **Applied and Environment Microbiology**, v. 70, p. 2161-2171, Washington, 2004.
- ELO et al. *Paenibacillus borealis* sp. nov., nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 535-545, 2001.
- EMMERT, E. e HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 1-9, Amsterdam, 1999
- FALCH, E. Industrial enzymes – developments in production and application. **Biotechnology advances**, v. 9, p. 643-658, 1991.
- FOLDES et al. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere os cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne and spoilage microrganisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 840-846, London, 2000
- FOLDERS et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 7044-7052, 2001.
- GILKES et al. Domains in Microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, Function and enzyme families. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 303-315, Washington, 1991.
- GIRARDIN et al. Antimicrobial activity of food borne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 806-813, Ames, 2002.

- GOSALBES et al. Two β -glycanases genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 7705-7710, 1991.
- GUPTA, R.; BEG, Q.K. e LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.
- HAGIHARA et al. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1744-1750, Washington, 2001.
- HAKI, G.D. e RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a Review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.
- HANDELSMAN et al. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 713-718, Washington, 1990.
- HANDELSMAN, J. e STABB, E. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1855-1869, 1996
- HASHIMOTO et al. Xanthan lyase of *Bacillus* sp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from xanthan side chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3765-3768, Washington, 1998.
- HEYNDRICKX et al. Reclassification of *Paenibacillus* (formely *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formely *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 270-379, 1996.
- HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: some applications of their products for Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 735-750, 1999.
- IGARASHI et al. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3282-3280, Washington, 1998.
- JADAMUS, A. ; VAHJEN, W. e SIMIN, O. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. **Archives Tierernahr**, v. 54, p. 1-17, 2001.
- JAEGER, K. Et al. Bacterial Lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, Amsterdam, 1994.
- JARGER, J. e REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.

- KAUR et al. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 17, p. 125-129, 2001.
- KASHYAP et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a Review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.
- KIM, D.S.; COOK, R.J e WELLER, D.M. *Bacillus* sp L324-92 for biological control of three root diseases of Wheat grown with reduced Tillage. **Phytopathology**, v. 87, p. 551-558, 1997.
- KIOSSEOGLOU et al. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 in batch culture. **Food research International**, v. 36, p. 425-430, 2003.
- KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K. e BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 239-256, Amsterdam, 2002.
- KOBAYASHI et al. Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolysaccharidase from a strain of *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 70-75, 2001.
- KOUKER, G. e JAEGER, K. Specific and sensitive Plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 211-213, Washington, 1987.
- KULKARNI, N; SHENDYE, A e RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, Amsterdam, 1999.
- KUMAR, C. G.e TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.
- LEBBADI et al. Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 49-53, London, 1994
- LEE et al. *Paenibacillus daejeonensis* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2107-2111, 2002.
- LIN et al. Purification and partial characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1093-1095, Washington, 1996.
- LORITO et al. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan-1,3-glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 84, p. 398-405, 1994.

- LYND et al. Microbial cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002
- MARI, M.; GUIZZARDI, M. e PRATELLA, G.C. Biological control of gray mold in Pears by antagonistic Bacteria. **Biological Control**, V. 7, p. 30-37, 1996.
- MARTIN, J.F. e DEMAIN, A. L. Control of antibiotic Biosynthesis. **Microbiological Reviews**, v. 44, p. 230-251, Washington, 1980
- MAVINGUI, P e HEULIN, T. In vitro chitinase and antifungal activity of a soil rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. **Soil Biological Biochemistry**, v. 26, p. 801-803, 1994.
- McFADDIN, J. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Ed. Lippincot Williams e Williams, 3ª edição, 1999.
- MEEHAN, C.; BJOURSON, A. J. e McMULLAN, G. *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1681-1685, 2001
- MILNER et al. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3061-3065, Washington, 1996.
- NANKAI et al. Microbial System for polysaccharide depolymerization: Enzymatic route for Xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2520-2526, Washington, 1999.
- NIELSEN et al. Secondary metabolite endochitinase dependent antagonism toward plant pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3563-3569, Washington, 1998.
- NIELSEN, J. E. e BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial α -amilases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 253-274, 2000.
- NIELSEN, P. e SORENSEN, J. Multi target and medium-dependent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 183-192, Amsterdam, 1997.
- NISSEN-MEYER, J. e NES INGOLF. Ribossomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. **Archives in Microbiology**, v. 167, p. 67-77, Berlin, 1997
- CLADERA-OLIVEIRA, F. Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40. 118f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto alegre, 2004.

- OUJERIOUAT et al. On the mechanism of α -amylase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 3871-3879, 2003.
- OSCARIZ, J.C. e PISABARRO, A.G. Characterization and mechanism of action of cerein 7 , a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 361-369, London, 2000
- OSCARIZ, J.C. e PISABARRO, A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram positive bacteria. **International Microbiology**, v. 4, p. 13-19, 2001.
- PAPAGIANNI et al. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 73-80, 2001.
- PLEBAN, S.; CHERNIN, L. e CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 284-288, London, 1997.
- PICHARD, B.; LARUE, J.P. e THOUVENOT, D. Gavaserin and salvatalin, new peptide antibiotics producedo by *Bacillus polymyxa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, p. 215-218, Amsterdam, 1995.
- PIURI, M.; RIVAZ, C.S. e RUZAL, S.M. A novel antimicrobioal activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 9-13, London, 1998.
- PURI, S.; BEG, Q.K. e GUPTA, R. Optimization of Alkaline Protease production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. **Current Microbiology**, v. 44, p. 286-290, Oxford, 2002.
- PRIM et al. *estA*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 303-312, 2000.
- RAO et al. Molecular and Biotechnological aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.
- RATANAKHANOKCHAI et al. Purification and properties os a xylan binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 694-697, Washington, 1999.
- RENGPIPAT et al. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pound-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. **Dis. Aquatic organism**, v, 55, p. 169-173, 2003.
- REQUE, et al. Isolation, Identification and Physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in Chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 303-317, 2000.

ROBSON, L e CHAMBLISS, G. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 11, p. 626-644, 1989.

ROJAS-AVELIZAPA et al. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 15, p. 299-308, 1999.

RUIJSSENAARS et al. A pyruvated mannose-specific Xanthan Lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2446-2452, Washington, 1999.

SAKAI et al. Purification and Characterization of Three Thermostable endochitinases of a Noble *Bacillus* strain, MH-1, Isolated from chitin-containing Compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3397-3402, Washington, 1998.

SAKIYAMA et al. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 117-121, London, 2001.

SANCHEZ et al. Synergistic activity of *Paenibacillus* sp. BP – 23 cellobiohydrolase Cel48C in association with the contiguous endoglucanase Cel9B and with endo- or exo- acting glucanases from *Thermobifida fusca*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 87, p. 161-169, 2004.

SHARMA, R.; CHSTI, Y. e BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterizations and Applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SELDIN et al. Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic microorganisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 423-427, London, 1999.

SHIDA et al. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoiensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 299-306, 1997.

SINGH, J.; BATRA, N. e SOBTI, R. C. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 51-56, 2004.

SILO-SUH et al. Biological activities of Two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2023-2030, Washington, 1994.

SILVEIRA, A. B. Identificação e caracterização Genética de Isolados de *Paenibacillus* spp provenientes de Amostra de água e solo. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SMITH, K.P.; HAVEY, M.J. e HANDELSMAN, J. Supression of Cotton Leak of Cucumber with *Bacillus cereus* UW85. **Plant Disease**, v. 77, p. 139-142, 1993.

- SOMMER, P.; BORMANN, C. e GOTZ, F. Genetic and Biochemical Characterization of a New Extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3553-3560, Washington, 1997.
- STEELE, D.B e STOWES, M.D. Technics for selections of industrially important microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 49-106, 1991.
- STEPHENSON K. e HARWOOD, C. Influence of a Cell-wall-associated protease on production of α -amylase by *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2875-2881, Washington, 1998.
- STEHR et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 347-355, 2003.
- SUBRAMANIYAN, S. e PREMA, P. Cellulase free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 1-7, Amsterdam, 2000.
- SUBRAMANIYAN, S. e PREMA, P. Biotechnology of microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-64, 2002.
- TAMBURINI et al. Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the water retting process. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 730-736, 2003.
- TAMEHIRO et al. Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 315-320, 2002.
- TAMEHIRO et al. Innovative approach for improvement of an Antibiotic-overproducing Industrial Strain *Streptomyces albus*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 69, p. 6412-6417, 2003.
- THOMSON, J. Molecular biology of Xylan degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 65-82, Amsterdam, 1993.
- TRACHUK et al. Chitinases of *Bacillus licheniformis* B-6839: isolation and properties. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 307-315, Ottawa, 1996.
- UETANABARO et al. *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1051-1057, 2003.
- VIIKARI et al. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 335-350, Amsterdam, 1994
- VON DER WEID et al. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. **International Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2147-2153, 2002.

- VON DER WEID et al. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1143-1151, 2003.
- WALKER, R.; POWELL, A.A.e SEDDON, B. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 791-801, 1998.
- WANG S. e CHANG, W. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymas extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 380-386, Washington, 1997.
- WANG, S. e HWANG, J. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 376-382, 2001.
- WATANABE et al. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 4017-4022, 1990.
- YANG et al. Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 406-413, 2000.
- YOON et al. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, p. 833-837, 1998.
- YOON et al. *Paenibacillus chijuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 415-421, 2002.
- YOON et al. *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., biofloculants for efficient harvesting of algal cells. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 295-301, 2003.
- YOSHIDA et al. Antimicrobial activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry leaves. **Biological Control**, v. 91, p. 181-187, 2001.

8. APÊNDICE

8.1 Meios de culturas utilizados

8.1.1 Água peptonada 0,1%

Peptona bacteriológica	1,0g
Água destilada	1000,0 mL

Dissolver em água destilada e autoclavar.

8.1.2 Agar e Caldo Sabouraud.

Glicose	2%
Peptona Bacteriológica	1%
Extrato de Levedura	0,5%
Ágar	2%

Dissolver em água destilada e autoclavar.

8.1.3 Caldo BHI Tamponado pH 6,0

Caldo BHI Merck	37,0g
Solução de KPO^4	$0,1\text{mol L}^{-1}$
Água destilada	1000mL

Dissolver BHI em água destilada e adicionar a solução tampão para ajustar concentração final em $0,1\text{mol L}^{-1}$ e autoclavar.

8.1.4 Solução Salina 0,85%

Cloreto de Sódio	8,5g
Água destilada	1000mL

8.1.5 Ágar Nutriente

Extrato de Carne	3,0g
Peptona de Carne	5,0g
Água destilada	1000,0mL

Dissolver em água destilada e autoclavar.

8.2 Reagentes utilizados

8.2.1 Lugol

Iodo	1g
Iodeto de potássio	2g
Água destilada	1000mL

Triturar os ingredientes secos e adicionar pequenas quantidades de água destilada.

8.2.2 Vermelho Congo 1% e 5%

Vermelho Congo	1,0g ou 5,0g
Água destilada	100,0 mL

Dissolver o pó em água destilada e homogeneizar por alguns minutos.

8.2.3 Solução de Rodamina B 0,001%

Rodamina B (Lynth)	0,001g
Água destilada	100,0mL

Dissolver o pó e filtrar em membrana 0,22µm.

8.2.4 Tampão PBS

NaCl	8g
Kcl	0,2g
Na ² HPO ⁴	1,4g
KH ² PO ⁴	0,24g
Água destilada	1000mL