

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS
SECRETADAS PELA BACTÉRIA *Burkholderia cepacia*

MARIANA FEITOSA DE DEUS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO 2007

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS
SECRETADAS PELA BACTÉRIA *Burkholderia cepacia*

MARIANA FEITOSA DE DEUS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES –RJ

MAIO 2007

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1) A ASSOCIAÇÃO ENTRE FORMIGAS E MICRORGANISMOS	4
2.2) TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS DO COMPLEXO <i>B. cepacia</i>	6
2.3) <i>B. cepacia</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. E CONTROLE BIOLÓGICO	7
2.4) PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBIÓTICOS POR BACTÉRIAS	8
2.4.1) <i>Pseudomonas</i> sp.	8
2.4.2) <i>Burkholderia cepacia</i>	9
2.5) MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA	10
2.5.1) <i>Candida albicans</i>	10
2.5.2) <i>Prototheca zopfii</i>	11
3) OBJETIVOS	12
4) MATERIAL E MÉTODOS	13

4.1) MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS	13
4.1.1) <i>Burkholderia cepacia</i> (ISOLADO 2b)	13
4.1.2) FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	14
4.1.3) FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	14
4.1.4) <i>Prototheca zopfii</i> (Alga) e <i>Candida albicans</i> (Levedura)	14
4.2) ANÁLISE FILOGENÉTICA ATRAVÉS DA SEQÜÊNCIA <i>recA</i> DO ISOLADO 2b DE <i>B. cepacia</i>	15
4.3) TESTES DE INIBIÇÃO EM MEIO SÓLIDO	15
4.4) TESTE DE INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>B. bassiana</i> EM MEIO LÍQUIDO	16
4.5) OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>B. cepacia</i>	16
4.6) DOSAGEM DE PROTEÍNAS	17
4.7) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)	17
4.8) VISUALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS SEPARADAS POR ELETROFORESE	17
4.9) CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO EM SEPHACRYL S-200	18
4.10) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE) PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA CONTRA OS MICRORGANISMOS ALVO	18
4.11) TESTE DE INIBIÇÃO DE <i>Candida albicans</i> e <i>Prototheca zopfii</i> PELAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>B. cepacia</i>	19
4.12) TESTE DA ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS	19
5) RESULTADOS	21
5.1) CULTIVO DE <i>Burkholderia cepacia</i>	21
5.2) ANÁLISE FILOGENÉTICA ATRAVÉS DA SEQÜÊNCIA <i>recA</i> DO ISOLADO 2b DE <i>B. cepacia</i>	22
5.3) ENSAIO DE INIBIÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E ENTOMOPATOGÊNICOS PELA <i>B. cepacia</i> EM PLACAS DE PETRI	24
5.4) TESTE DE INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>B. bassiana</i> EM MEIO LÍQUIDO	26

5.5) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PRODUZIDAS POR <i>B. cepacia</i>	27
5.6) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS	28
5.7) PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>B. cepacia</i> (FILTRADO ESTÉRIL) POR CROMATOGRAFIA EM GEL FILTRAÇÃO S-200	29
5.8) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS DAS FRAÇÕES COLETADAS APÓS A CROMATOGRAFIA EM GEL FILTRAÇÃO	30
5.9) TESTE DE INIBIÇÃO DE <i>C. albicans</i> PELAS PROTEÍNAS PURIFICADAS NA CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	31
5.10) TESTE DE INIBIÇÃO DA <i>Prototheca sp.</i> POR <i>B. cepacia</i>	32
5.11) ENSAIO DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>B. bassiana</i> COM PROTEÍNAS TRATADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS	34
6) DISCUSSÃO	36
7) CONCLUSÕES	41
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amônio
FC	Filtrados de culturas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletenodiana
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

DEUS, MARIANA FEITOSA DE. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO. MAIO DE 2007. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS SECRETADAS POR *Burkholderia cepacia*. ORIENTADOR: DR. RICHARD IAN SAMUELS.

Um isolado de *Burkholderia cepacia*, identificado pelas seqüências de gene do rRNA 16S e 23S, obtido de uma colônia da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* secretou proteínas com atividade antibiótica contra uma variedade de microrganismos. Este estudo investigou a importância dessa bactéria como possível fonte de antibióticos para o controle de doenças de animais e de plantas e realizou a análise filogenética da seqüência recA do isolado 2b de *B. cepacia*. As seqüências com maior similaridade ao isolado 2b foram AF456110 e AF456120 (*B. cepacia* – genomovar I) representados aqui pelos seus números de acesso no banco de dados do NCBI. Testes de desafio em placas de Petri mostraram que *B. cepacia* inibiu os seguintes patógenos de plantas: *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*,

Rizophus sp. e *Pestalotia sp.*, mas não inibiu *Ceratocystis sp.*. Filtrados de culturas (FC) de *B. cepacia* foram obtidas através do crescimento em Caldo Nutriente (Oxoid) acrescido de glicerol (2 %) com agitação (180 rpm) por 24-120h. A cultura de bactéria foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi esterilizado com filtro Millipore (0,22 µm). FC foi testado contra microrganismos de importância veterinária usando a técnica de densitometria de suspensão de células (510 nm) e ensaio de inibição de unidade formadora de colônias (CFUs) em meio de crescimento seletivo. As culturas filtradas inibiram a divisão celular *in vitro* de *Prototeca zopfii* (algae) e *Candida albicans* (levedura). O perfil das proteínas secretadas obtidas por SDS-PAGE e a alta atividade inibitória foram vistos na cultura filtrada de 96 e 120 h de incubação, coincidindo com o aparecimento de proteínas de aproximadamente 45-30 kDa. Através do ensaio de incubação de cortes do gel que continham as proteínas, foi possível verificar que a atividade inibitória contra *P. zopfii* estava associada a proteínas de aproximadamente 30 kDa.

ABSTRACT

DEUS, MARIANA FEITOSA DE. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO. MAY 2007. PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PROTEINS SECRETED BY *Burkholderia cepacia*. ADVISER: DR. RICHARD IAN SAMUELS.

An isolate of *Burkholderia cepacia*, identified by 16S and 23S rRNA gene sequences, originally obtained from colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*, was found to secrete proteins with antibiotic activity against a wide range of microorganisms. The role of this bacterium in the context of leaf-cutting ant colony protection has been previously studied and currently we are investigating its importance as a possible source of antibiotics for the control of animal diseases and plant pathogens and accomplished the phylogenetic analysis of the recA sequence of isolate 2b. The sequences with the strongest similarity to isolate 2b were AF456110 and AF456120 (*B. cepacia* – genomovar I) listed here by their accession numbers at NCBI. Agar plate challenge tests showed that *B. cepacia* inhibited the following plant pathogens: *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*, *Rizophus sp.* and *Pestalotia sp.*, but did not inhibit *Ceratocystis sp.*. Culture filtrates (CF) of *B. cepacia* were obtained following growth in Nutrient broth (Oxoid) with

glycerol (2%), maintained at 180 rpm for 24 -120h. The bacterial culture was centrifuged at 13000 g for 15 minutes and the supernatant was sterilized with a Millipore filter (0.22 μm). CF was tested against target microorganisms using a cell suspension densitometry (510 nm) technique and colony forming unit (CFUs) inhibition assays in selective growth media. CF inhibited both CFUs and cell division *in vitro* of *Prototheca zopfii* (algae) and *Candida albicans* (yeasts). The profile of secreted proteins was obtained by SDS-PAGE and the highest inhibitory activity was seen in culture filtrate at 96h and 120h of incubation, coinciding with the appearance of proteins of approximately 45-30 kDa. Gel slices showed that the inhibitory activity against *P. zopfii* was associated to proteins of approximately 30 kDa.

1) INTRODUÇÃO

O termo antibiótico foi definido, segundo Waksman em 1947, como uma substância produzida por microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetos) prejudicial ao desenvolvimento de outros microrganismos em altas diluições. Atualmente o termo inclui também os antibióticos sintéticos como as sulfonamidas e as quinolonas.

O primeiro relato na literatura sobre a síntese de um antibiótico foi feito por Alexander Fleming em 1929, que extraiu a penicilina a partir do extrato do fungo *Penicillium notatum*, originando a mais variada e utilizada classe de antibióticos: os b-lactâmicos. A descoberta de Fleming impulsionou a pesquisa de novos antibióticos e atualmente está disponível comercialmente uma grande variedade de antibióticos produzidos por vários tipos de microrganismos, como a estreptomicina, neomicina e vancomicina, extraídas de diferentes espécies de *Streptomyces* (Waksman, 1947).

Muitos autores relatam que o uso indiscriminado de antibióticos pode levar ao aparecimento de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos

existentes, com isso é de extrema importância a pesquisa de novos agentes antimicrobianos (Anderson *et al.*, 2003).

Entre os microrganismos capazes de produzir antibiótico está a bactéria *Burkholderia cepacia*, pertencente à família Pseudomonadaceae, que produz antibióticos contra diversos fungos e bactérias tais como: pyrrolnitrino (El-Banna e Winkelmann, 1998), cepacina A e cepacina B (Parker *et al.*, 1984), xilocandina (Meyers *et al.*, 1987), cepacidina A (Lee *et al.*, 1994), entre outros.

B. cepacia é uma bactéria Gram-negativa, caracterizada por uma grande versatilidade nutricional e por um complexo genoma. Devido à existência de linhagens fenotipicamente iguais, mas genotipicamente diferentes, as linhagens de *B. cepacia* são classificadas em genomovares distintos, que compõem o complexo de *B. cepacia*. Essas estão presentes naturalmente no solo, na água, em associação comensal com plantas (particularmente nas raízes) e também têm sido isoladas de pacientes com fibrose cística, representando um importante patógeno oportunista (Parke e Gurian-Sherman, 2001).

Outra característica importante de *B. cepacia* é que possui uma capacidade metabólica de degradar compostos halogenados como tricloroetileno, que é uma substância tóxica e cancerígena presente no solo e águas poluídas. O metabolismo de *B. cepacia*, juntamente com compostos aromáticos como fenol e tolueno, permite degradar substâncias prejudiciais ao meio ambiente (Landa *et al.*, 1994; Schmidberger *et al.*, 2005).

Devido à sua capacidade de produzir antibióticos contra fungos que atacam plantas, alguns autores estudam o uso de linhagens de *B. cepacia* presentes naturalmente no solo, para o controle biológico de patógenos. Contudo devem ser feitos testes que comprovem a segurança das linhagens obtidas do solo, como testes bioquímicos, de patogenicidade, toxicidade e com marcadores genéticos (Parke e Gurian-Sherman, 2001).

Um recente estudo isolou a bactéria *Burkholderia sp.* do jardim do fungo simbiote da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Santos *et al.*, 2004). Essa formiga cultiva o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus*, que tem a função de disponibilizar alimentos para as formigas; em troca elas suprem os

fungos com folhas cortadas que servem de substrato para o seu crescimento (Currie, 2001). *Burkholderia sp.* poderia estar atuando como um terceiro mutualista na relação entre formigas e fungos, com um possível papel de proteção contra contaminantes, já que produz vários compostos com ação antifúngica (Santos *et al.*, 2004).

B. cepacia foi isolada de jardins de fungos em 56 % dos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* e inibiu fortemente o crescimento dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, o parasita especialista *Escovopsis weberi* e o saprófita *Verticillium lecanii*, mas não inibiu o crescimento do mutualista *L. gongylophorus*. Segundo Santos *et al.* (2004), essa bactéria produtora de antibiótico foi encontrada também no solo adjacente aos jardins de fungos, sugerindo que as formigas adquirem esta bactéria de forma seletiva proveniente do ambiente.

Portanto, neste trabalho foram investigadas a produção de compostos antibióticos produzidos por *B. cepacia*, bem como a ação destes sobre fungos fitopatogênicos e de importância veterinária.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) - A associação entre formigas e microrganismos

As formigas que cultivam fungos pertencem à tribo Attine (Formicidae) e estão presentes estritamente no Novo Mundo e em grande parte da região Neotropical, compreendendo um grupo monofilético de cerca de 210 espécies descritas, todas dependentes do cultivo de fungo como fonte alimentar (Weber, 1972). As formigas em geral têm a característica de viver em colônias, com divisão de tarefas e trabalhos entre si.

Formigas cortadeiras - quenquéns (*Acromyrmex*) e saúvas (*Atta*) possuem grande importância econômica, pois causam inúmeros prejuízos em lavouras. Plantações de eucalipto, cana-de-açúcar, café, milho, entre outras, sofrem frequentemente sérios danos devido ao ataque de formigas cortadeiras (Cherrett, 1986).

Essas formigas cultivam o seu próprio alimento, o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (família Lepiotaceae), cortando grandes quantidades de material vegetal para suprir o fungo que fornece nutrientes às

formigas, representando a única fonte de alimento para as larvas e a rainha como pode-se observar na figura 1 (Currie, 2001). Nessa associação entre formigas e fungos existe um terceiro mutualista que é uma bactéria filamentosa (actinomiceto) do gênero *Streptomyces*. Essa bactéria protege os jardins de fungos das formigas contra parasitas especializados, pois produz antibióticos. *Streptomyces* sp. está presente nas pernas e região ventral do corpo dos insetos. As formigas, ao se locomoverem pelo jardim de fungos, espalham os compostos antibióticos, suprimindo o crescimento do fungo especializado do gênero *Escovopsis*, que parasita os jardins de fungos (Currie *et al.*, 1999, 2003).

Um estudo avaliou a infecção por *Escovopsis* nos jardins de fungos das colônias de *Atta octospinosus* e demonstrou que as colônias que tiveram a bactéria do gênero *Streptomyces* removida, a infecção foi mais severa, com uma significativa redução da massa dos jardins de fungo, quando comparada com os jardins onde a bactéria ainda estava presente. Assim, este terceiro mutualista beneficia os jardins de fungo, pois produz antibióticos específicos contra *Escovopsis*, impedindo seu desenvolvimento normal. Isso mostra que a simbiose existente entre fungos e formigas envolve outros microrganismos, tornando essa interação mais complexa e elaborada do que até então se pensava (Currie *et al.*, 2003).

Poulsen *et al.* (2003) avaliaram o custo e o modo de transmissão de *Streptomyces* sp. na colônia da formiga cortadeira *A. octospinosus* e observou que a taxa de respiração da formiga aumentou de 10 a 20 % quando a bactéria estava presente na cutícula. Isso ocorre devido à respiração direta da bactéria e ao possível excesso de respiração pelas formigas. As formigas tendem também a consumir mais o seu fungo mutualista quando a bactéria está presente. Já a transmissão desta bactéria parece acontecer das operárias mais velhas para as mais novas, podendo ocorrer também através dos jardins de fungos (Poulsen *et al.*, 2003).

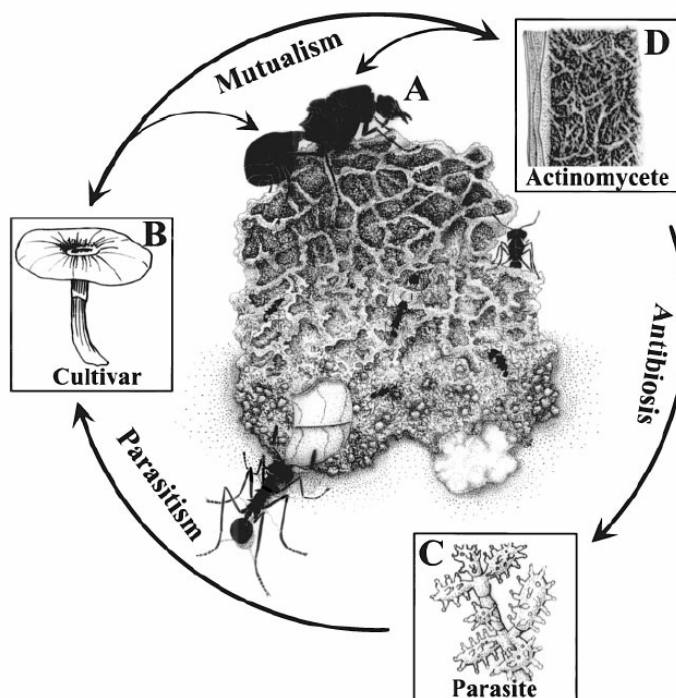


Figura 1: Representação esquemática da simbiose entre a formiga, seu fungo mutualista, o parasita do jardim de fungo e o actinomiceto que produz antibiótico (Currie, 2001).

2.2) Taxonomia e características do complexo *B. cepacia*

A bactéria *B. cepacia* pertence à família Pseudomonadaceae e sua primeira descrição na literatura foi feita em 1950 por Walter Burkholder, que isolou o causador da podridão em cebola.

As características mais importantes de *B. cepacia* são: bastonete Gram-negativo, aeróbia, possui requerimentos nutricionais simples e grande versatilidade metabólica, temperatura ótima de crescimento de 37 °C, mas podem crescer a 42 °C, resistentes a altas concentrações de sais, corantes, anti-sépticos fracos, e a maioria dos antibióticos comumente utilizados, catalase e oxidase (geralmente) positiva, possui pigmentos fluorescentes: plocianina e fluoresceína.

Essa bactéria possui uma complexa taxonomia, sendo classificada em nove genomovares - espécies fenotipicamente iguais mas genotipicamente diferentes (Parke e Gurian-Sherman, 2001):

- *B. cepacia* (genomovar I)
- *B. multivorans* (genomovar II)
- *B. cepacia* (genomovar III)
- *B. stabilis* (genomovar IV)
- *B. vietnamiensis* (genomovar V)
- *B. cepacia* (genomovar VI)
- *B. ambifaria* (genomovar VII)
- *B. anthina* (genomovar VIII)
- *B. pyrrocinia* (genomovar IX)

2.3) *B. cepacia*, *Pseudomonas* spp. e controle biológico

O controle biológico tem emergido como a principal alternativa ao uso de inseticidas. Alguns autores relatam o uso de *Pseudomonas* sp. como agentes no controle biológico de patógenos na fase de pós-colheita de frutos, como por exemplo banana (*Musa acuminata*) que são sujeitos a antracnose - doença causada pelo fungo *Colletotrichum dematium* que ataca na fase de pós-colheita. Um estudo utilizou *B. cepacia* isolada da própria fruta e esta bactéria foi efetiva contra *C. dematium* controlando a antracnose (Costa e Erabadupitiya, 2005). Esta bactéria também foi efetiva contra *Monilinia fructicola* quando aplicada em frutos de nectarina e pêssigo (Smilanick *et al.*, 1993).

A bactéria *Pseudomonas syringae* também apresenta potencial para ser utilizada em controle biológico como relatam alguns estudos que mostram sua eficácia contra o fungo *Penicillium* sp. que ataca maçãs (Errampalli e Brubacher, 2006) e pêras (Janisiewicz, 2005).

Burkholderia sp. também têm sido comumente isolada de raízes de plantas em associação comensal. Como exemplo, pode-se citar que *B. cepacia* foi isolada de raízes de tomates saudáveis e exibiu antagonismo contra bactérias e fungos patogênicos a plantas (Sfalanga *et al.*, 1999). Em outro estudo *B. cenocepacia*, que estava naturalmente presente em associação com raízes de milho, inibiu *in vitro* o crescimento de *Fusarium verticillioides*, um fungo fitopatogênico (Bevivino *et al.*, 2005). Essa bactéria também promoveu o crescimento de culturas de milho quando as sementes foram tratadas com a bactéria (Bevivino *et al.*, 1998). *B. cepacia* também promoveu o crescimento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) através da mobilização de fósforo, inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* e pelo aumento da nodulação que pode levar a um aumento na fixação de nitrogênio (Peix *et al.*, 2001). Em outro estudo *B. cepacia* e *B. ambifaria* foram testadas contra os patógenos *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* e *Meloidogyne incognita* que atacam pepino e causam severos danos a culturas destas hortaliças. As bactérias isoladas de raízes de pepino foram usadas no tratamento das suas sementes e observou-se que a combinação das duas espécies foi mais efetiva na inibição do crescimento dos patógenos se comparado ao tratamento com o uso de uma espécie isoladamente (Roberts *et al.*, 2005).

2.4) Produção de compostos antibióticos por bactérias

2.4.1) *Pseudomonas sp.*

Atualmente existem inúmeros compostos com atividade antibiótica produzidos por bactérias descritos na literatura, entre elas estão as bactérias dos seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Streptomyces* (Raaijmakers *et al.*, 2002). O crescente interesse por bactérias produtoras de antibióticos envolve a utilização como agente no biocontrole e a descoberta de novos compostos mais eficazes que os existentes no mercado.

Entre as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* com capacidade de produzir antibióticos destacam-se: *P. antimicrobica*, *P. fluorescens* e *P. aureofaciens* (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Pseudomonas sp. proximamente relacionada a *B. cepacia*, produz as cepafunginas I, II e III, que são denominados como acilpeptídeos neutros, solúveis em soluções alcoólicas e em dimetil sulfóxido. Possuem atividade inibitória contra fungos e leveduras como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* entre outros; entretanto não possuem atividade contra bactérias. Outra característica apresentada pelo complexo das cepafunginas é a atividade antitumoral em camundongos com leucemia (Shoji *et al.*, 1989).

Walker *et al.* (2001) relataram que a bactéria *P. antimicrobica* produz metabólitos antifúngicos que inibe a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, um patógeno que pode infectar uma grande variedade de plantas hospedeiras e extremamente difícil de controlar devido à sua complexa epidemiologia, esses metabólitos, portanto, podem ser eficientes no controle biológico (Walker *et al.*, 2001).

Outra bactéria que se destacou quanto à produção de antibióticos foi a *P. fluorescens*, que produz um composto lipopeptídeo cíclico denominado viscosinamide, que inibiu os fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Rizoctonia solani* tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Nielsen *et al.*, 1999).

2.4.2) *Burkholderia cepacia*

A primeira descrição de atividade antibiótica em *B. cepacia* foi feita por Parker *et al.* (1984), onde se verificou que a Cepacina A apresentou boa atividade contra *Staphylococcus* sp., mas foi pouco eficiente contra *Streptococcus* sp. e a maioria dos organismos Gram-negativos. Já a Cepacina B apresentou excelente atividade contra *Staphylococcus* e alguns organismos Gram-negativos (Parker *et al.*, 1984).

Alguns anos depois Meyers *et al.* (1987) relatou que *B. cepacia* também produzia outro antibiótico denominado xilocandina, que era um complexo de peptídeos eficazes contra fungos, mas com pouca ação contra bactérias .

Um outro composto com atividade antifúngica foi isolado de *B. cepacia* e denominado Cepacidina A. Este antibiótico foi classificado como um glicopeptídeo formado pela mistura de dois outros componentes: Cepacidina A₁ e Cepacidina A₂. Estes exibiram atividade contra fungos fitopatogênicos *in vitro* como *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, entre outros, mas também não apresentaram atividade contra bactérias (Lee *et al.*, 1994).

El-Banna e Winkelmann (1997) isolaram um composto de *B. cepacia* que apresentou atividade antibiótica contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias Gram-positivas. Esse composto foi denominado como Pirrolnitrina e possui efeito inibitório do sistema transportador de elétrons em mitocôndrias isoladas de *Neurospora crassa*. A Pirrolnitrina bloqueia a transferência de elétrons entre uma desidrogenase e um citocromo na cadeia respiratória. As bactérias Gram-positivas *Streptomyces* foram inibidas por esse composto.

2.5) Microrganismos de importância veterinária

2.5.1) *Candida albicans*

C. albicans pertence ao reino dos fungos, ao filo *Ascomycota* e à família *Saccharomycetaceae*. Frequentemente afeta humanos, causando micoses oportunistas, colonizando a pele e membranas mucosas. Também está associada a enfermidades em animais causando candidíase em cães e gatos (Ben-Ziony e Arzi, 2000) e mastite em bovinos (Moretti *et al.*, 1998; Krukowski *et al.*, 2001). Este microrganismo é encontrado livre no ambiente, em folhas, flores, água e no solo. Frequentemente é isolado no ambiente hospitalar causando infecções em humanos e recém-nascidos (Pfaller *et al.*, 1998).

2.5.2) *Prototheca zopfii*

Prototheca spp. são algas unicelulares, sem clorofila, de distribuição universal, responsáveis por diversas infecções em animais e no homem. Podem ser encontradas no solo, plantas, fezes de bovinos e estão associadas à mastite aguda e crônica em animais. *P. zopfii* já foi isolada de fêmeas de bovinos como agente da mastite (Ribeiro *et al*, 1998).

Como a *Prototheca* sp. possui resistência “*in vitro*” a vários agentes antimicrobianos, é importante que novas alternativas para o tratamento de mastite causada por esse microrganismo, sejam testadas (Langoni *et al.*, 1994).

3) OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi isolar proteínas com atividade antibiótica extraídas de *B. cepacia* isoladas proveniente do jardim do fungo simbiote da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, bem como testar a ação destas proteínas sobre fungos entomopatogênicos, fitopatogênicos e dos microrganismos de importância veterinária: *Prototheca zopfii* (algae) e *Candida albicans* (levedura). Apesar de existirem outros trabalhos sobre antibióticos produzidos por *B. cepacia* descritos na literatura, como peptídeos, por exemplo, até o momento não existem relatos sobre proteínas com ação antibiótica isoladas dessa bactéria.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Manutenção e cultivo dos microrganismos

4.1.1) *Burkholderia cepacia* (isolado 2b)

Um isolado de *B. cepacia* (2b), identificado pelas seqüências de genes do rRNA 16S e 23S, obtido de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa*, foi mantido a - 80 °C em caldo nutriente (Oxoid) contendo glicerol (2,0%). A bactéria foi cultivada conforme descrito por Santos (2003), com algumas adaptações.

B. cepacia foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar nutriente (Oxoid) e mantida em câmara BOD a 26 °C por 48h. Após o crescimento foi repicada em meio de cultivo líquido (Caldo Nutriente) e mantida por 24h em câmara BOD a 26 °C. Transferiu-se uma alíquota de 2 mL para frascos de Nalgene (Nalge Company, USA) contendo 100 mL de meio Caldo Nutriente com glicerol (2%). Os frascos foram mantidos em um agitador orbital a 180 rpm, a 28 °C, por um período de 24 a 120 horas. Os frascos foram retirados em intervalos de 24h de cultivo (24, 48, 72, 96 e 120h) e armazenados em freezer para realização de testes posteriores. O crescimento da bactéria após cada tempo de

cultivo foi quantificado através da absorbância a 600 nm medidos em um espectrofotômetro.

O fluxograma da figura 2 mostra todas as etapas realizadas na metodologia.

4.1.2) Fungos entomopatogênicos

Os isolados de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (CG24) e *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818) foram obtidos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF). Esses fungos foram periodicamente repicados em meio SDA ¼: glucose (1%), peptona (0,25%), extrato de levedura (0,5%), agar (2%) e mantidos em câmara BOD a 26 °C por 15 dias, sendo posteriormente estocados a 4 °C.

4.1.3) Fungos fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos utilizados, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*, *Rizophus sp.*, *Pestalotia sp.* e *Ceratocystis sp.*, foram obtidos na Clínica Fitosanitária do LEF. Estes fungos foram repicados em meio SDA ¼ e mantidos em câmara BOD a 26 °C.

4.1.4) *Prototheca zopfii* (Alga) e *Candida albicans* (Levedura)

Os testes com os microrganismos *P. zopfii* e *C. albicans* foram realizados por colaboradores do Laboratório de Sanidade Animal/ CCTA/ UENF, assim como a manutenção e cultivo desses microrganismos.

4.2) Análise filogenética através da seqüência recA do isolado 2b de *B. cepacia*

Na análise filogenética, foi avaliada a proximidade do clone 2b de *B. cepacia*, isolado por Santos (2003), com outras bactérias do complexo de *Burkholderia* sp..

O clone 2b foi amplificado por PCR usando os iniciadores BRC1 e BRC2 (Mahenthiralingam *et al.*, 2000), e o fragmento final 5' foi obtido usando os iniciadores BRC1 e BRC4, conforme a tabela abaixo:

BRC1	5' TGACCGCCGAGAAGAGCAA	3'
BRC2	5' CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	3'
BRC4	5' GCGCAGCGCCTGCGACAT	3'

Tabela 1: Iniciadores usados nesse estudo.

As 20 seqüências de nucleotídeos com maior similaridade ao produto do PCR foram selecionadas por BLAST (NCBI). As seqüências usadas na análise filogenética foram listadas pelo número de acesso no banco de dados. Uma única seqüência recA de *Burkholderia pseudomallei* foi selecionada, e usada para originar a árvore. As seqüências foram alinhadas pelo CLUSTAL W do Instituto Europeu de Bioinformática e a árvore foi desenvolvida usando o TREEVIEW (Page, 1996).

4.3) Testes de inibição em meio sólido

Suspensões de 10^6 conídios/mL de fungos fitopatogênicos (*Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Rizophus* sp., *Pestalotia* sp., *Ceratocystis* sp.) e entomopatogênicos (*B. bassiana* e *M. anisopliae*) foram inoculadas, com auxílio de um "swab", em placas de Petri contendo meio SDA ¼. Após a absorção do excesso de líquido pelo meio, a bactéria *B. cepacia* foi inoculada no centro da placa com auxílio de uma alça de platina. As placas foram mantidas em câmara de

BOD a 26 °C e após 48 h foi feita a observação da presença ou não do halo de inibição da germinação dos fungos testados.

4.4) Teste de inibição da germinação de conídios de *B. bassiana* em meio líquido

Este teste foi feito com os sobrenadantes das colônias de *B. cepacia* de 24, 48, 72, 96 e 120 h, esterilizados por filtro Millipore (0,22 µm). Para preparar 1 mL de cada amostra foi adicionado 30 µL de uma solução de 10^6 conídios/mL e *B. bassiana* (isolado CG24) a 300 µL de filtrado estéril de *B. cepacia* e 700 µL de caldo nutriente acrescido de glicerol (2%). Para o controle foram adicionados apenas 30 µL de uma solução de 10^6 conídios/mL do fungo testado a 1 mL de caldo nutriente acrescido de glicerol (2%). Em seguida foram colocados 300 µL da suspensão final em cavidades de placas de Elisa estéril. Para cada amostra foram feitas três repetições. A placa foi coberta com parafilme e mantida em câmara úmida (BOD), a 26 °C. Após 15 h foi feita a contagem dos conídios germinados e não germinados, com o auxílio de um microscópio invertido. Foram feitas duas contagens aleatórias por cavidade, contando-se 100 conídios no campo de visão (objetiva de 25x). Foi considerado germinado o conídio que apresentou o tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu diâmetro.

4.5) Obtenção de proteínas secretadas por *B. cepacia*

Após o cultivo da bactéria em caldo nutriente com glicerol 2%, a suspensão foi centrifugada a 13000 rpm (rotações por minuto) por 15 min. O sobrenadante obtido foi submetido a uma filtração em membrana Millipore (0,22 µm).

O filtrado estéril foi então dializado contra água destilada em uma membrana de diálise de 12 kDa “cut off” por 24 h a 40 °C sob agitação e liofilizado para a concentração das proteínas.

4.6) Dosagem de proteínas

Após o cultivo de *B. cepacia* por 24, 48, 72, 96 e 120 h, as proteínas presentes nos extratos brutos foram dosadas pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado a partir de 10 mg de Coomassie Blue G, 5 mL de metanol, 10 mL de ácido fosfórico (85%) e água destilada.

O extrato contendo as proteínas foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos, obtendo-se um sobrenadante e um precipitado que foram quantificados quanto ao teor de proteínas por Bradford. Uma curva padrão foi montada com albumina bovina (1 mg/mL). As absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 595 nm.

4.7) Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE)

As proteínas obtidas após o cultivo da bactéria *B. cepacia* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O gel foi montado segundo o método de Laemmli (1970), que consiste em um gel de separação contendo 10% de acrilamida, SDS 10%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, APS 10% e TEMED e um gel de concentração contendo 3% de acrilamida, SDS 10% , Tris-HCl 1 M pH 6,8, APS e TEMED. Neste gel foram aplicados 30 μ L da amostra contendo as proteínas dissolvidas em tampão de amostra sem β mercaptaetanol. A eletroforese transcorreu sob voltagem constante (100 Volts) e temperatura ambiente por 2 horas.

4.8) Visualização de proteínas separadas por eletroforese

Após a eletroforese o gel foi corado com uma mistura de 0,05% de Coomassie Blue R dissolvido em 40% de metanol e 7% de ácido acético por 2 horas sob agitação constante e temperatura ambiente. Após isso foi descorado com uma mistura composta por 28% de metanol e 8% de ácido acético.

4.9) Cromatografia de gel filtração em Sephacryl S-200

Uma coluna de 54 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro preenchida com resina Sephacryl S-200 (Amersham Pharmacia Biotech) foi calibrada com os seguintes padrões de massa molecular: albumina bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e lisina (14 kDa).

O filtrado estéril de *B. cepacia* após diálise e liofilização, foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,0 e misturado a 50 µL de glicerol, sendo então aplicado na coluna, previamente equilibrada com o mesmo tampão. As frações foram eluídas com o tampão em um fluxo de 0,4 mL/min e analisadas quanto ao teor de proteínas a 595 nm em leitor de Elisa, para isso foi adicionado 200 µL de Bradford a cada 20 µL da fração coletada. Após as leituras as frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e usadas no teste de inibição contra os microrganismos alvo.

4.10) Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE) para obtenção de proteínas com atividade inibitória contra os microrganismos alvo

Após a eletroforese descrita no tópico 4.7, foram incubadas uma raia do gel que continha a amostra e uma raia controle (sem amostra) com Triton 2,5% durante 15 minutos, por duas vezes, sob agitação e a temperatura ambiente. Após isso o gel permaneceu em água destilada por 5 minutos.

Para a extração das proteínas, o gel foi cortado em tiras de 2 mm e colocadas em tubos eppendorf contendo 500 µL de água destilada que foram numerados em seqüência. Após a maceração do gel no eppendorf a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante utilizado no teste de inibição dos microrganismos alvo.

4.11) Teste de inibição de *Candida albicans* e *Prototheca zopfii* pelas proteínas secretadas por *B. cepacia*

Os testes de inibição dos microrganismos de importância veterinária foram feitos com proteínas de *B. cepacia* extraídas de duas formas:

a) Para testar a inibição de *C. albicans* utilizou-se as proteínas separadas em cromatografia de gel filtração S-200 (item 4.9).

b) Para testar a inibição da *Prototheca* as proteínas foram extraídas diretamente do gel de poliacrilamida (item 4.10).

Para a realização dos testes, misturou-se 1,5 mL de caldo Sabouraud contendo 2% de dextrose, 400 µL de proteínas e 100 µL do microrganismo alvo (0,5 McFarland), e incubou-se a 37 °C por 4 h. Após isso foram feitas leituras em um densitômetro, em intervalos de 2 h até completar 12 h. Foi feito também um controle, onde foi utilizada uma raia do gel onde não foi aplicada amostra.

4.12) Teste da estabilidade das proteínas em diferentes temperaturas

Proteínas obtidas após o cultivo de *B. cepacia* foram submetidas a diferentes temperaturas e posteriormente avaliadas quanto a atividade de inibição da germinação de conídios de *B. bassiana*. Alíquotas de 50 µL do extrato de proteínas foram incubadas a 30, 50 e 70 °C por 10, 20, 30 e 40 minutos.

Os testes de inibição da germinação de conídios de *B. bassiana* foram realizados em placas de Elisa (conforme descrito no tópico 4. 4).

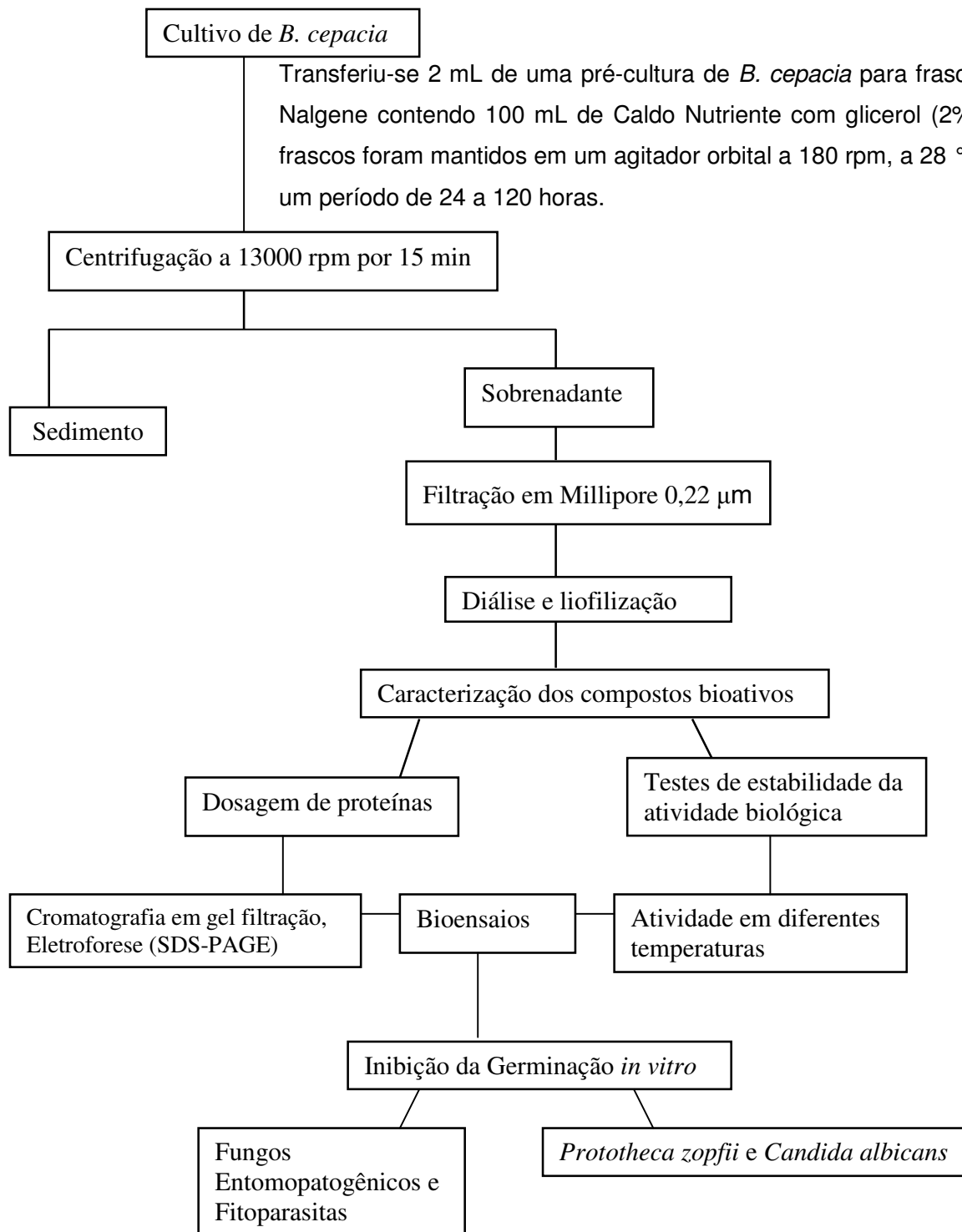


Figura 2 - Fluxograma apresentando o esquema de purificação e caracterização de proteínas com atividade antifúngica e antibiótica produzidos por *B. cepacia*.

5) RESULTADOS

5.1) Cultivo de *Burkholderia cepacia*

Na figura 3 pode-se observar o perfil de crescimento de *B. cepacia* cultivada, conforme descrito por Santos (2003). Após cada período de cultivo da bactéria (24, 48, 72, 96, 120 h) foi determinada a absorbância a 600 nm, que é diretamente proporcional a densidade de células. Pode-se observar que entre 24 e 96 h a bactéria está em fase de multiplicação celular e após 96 h de cultivo entra na fase estacionária.

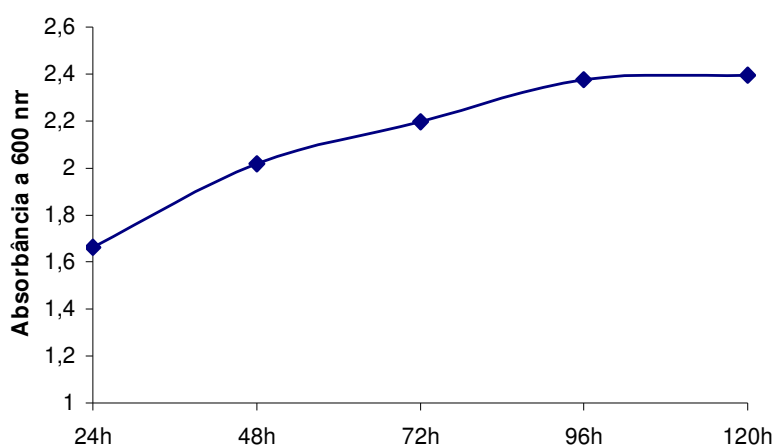


Figura 3 – Acompanhamento do crescimento de *B. cepacia* em diferentes tempos de cultivo.

5.2) Análise filogenética através da seqüência recA do isolado 2b de *B. cepacia*

A figura 4 mostra a árvore filogenética construída através da análise de seqüências de nucleotídeos do isolado 2b de *B. cepacia*, comparando com o seqüenciamento do banco de dados do NCBI. A árvore contém as 20 seqüências mais similares ao isolado 2b que estão representadas pelo número de acesso ao banco de dados.

Nesta árvore, nota-se que os isolados mais próximos ao isolado 2b são: AF456110 (isolado MC 366) e AF456120 (isolado R-9334), sendo que esses dois isolados são classificados como *B. cepacia* pertencente ao genomovar I.

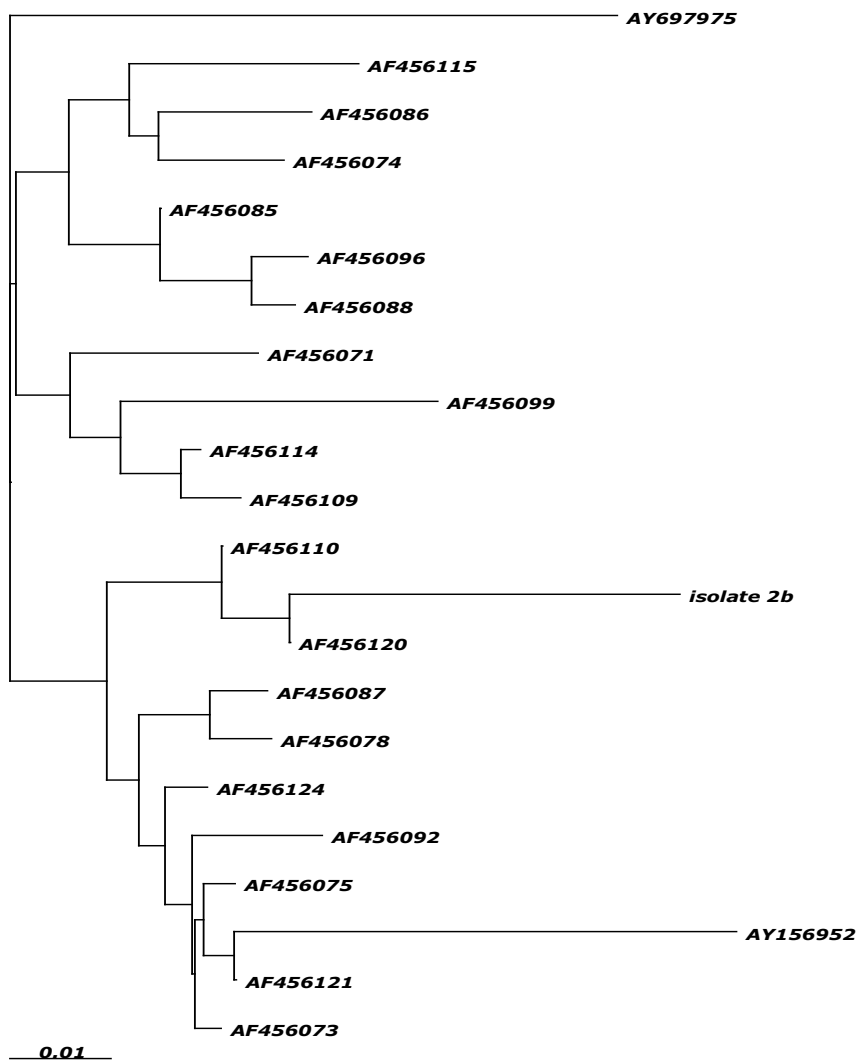


Figura 4 – Árvore filogenética construída para comparação de seqüências de isolados de *B. cepacia* do banco de dados (NCBI) com o isolado 2b.

5.3) Ensaio de inibição de fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos por *B. cepacia* em placas de Petri

A figura 5 mostra a inibição dos fungos fitopatogênicos: *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*, *Rizophus sp.* (Zigomycete) e *Pestalotia sp.* e dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, quando estes foram inoculados em placa de Petri contendo a *B. cepacia* (inoculada no centro da placa), para todos os fungos testados foi feito um controle onde apenas o fungo foi inoculado.

O fungo que mais sofreu inibição foi o *A. niger* (Fig. 5 – B), onde pode-se observar o maior halo de inibição e o único fungo onde não houve a formação de halo de inibição foi o *Ceratocytis sp.* (Fig. 5 – D).

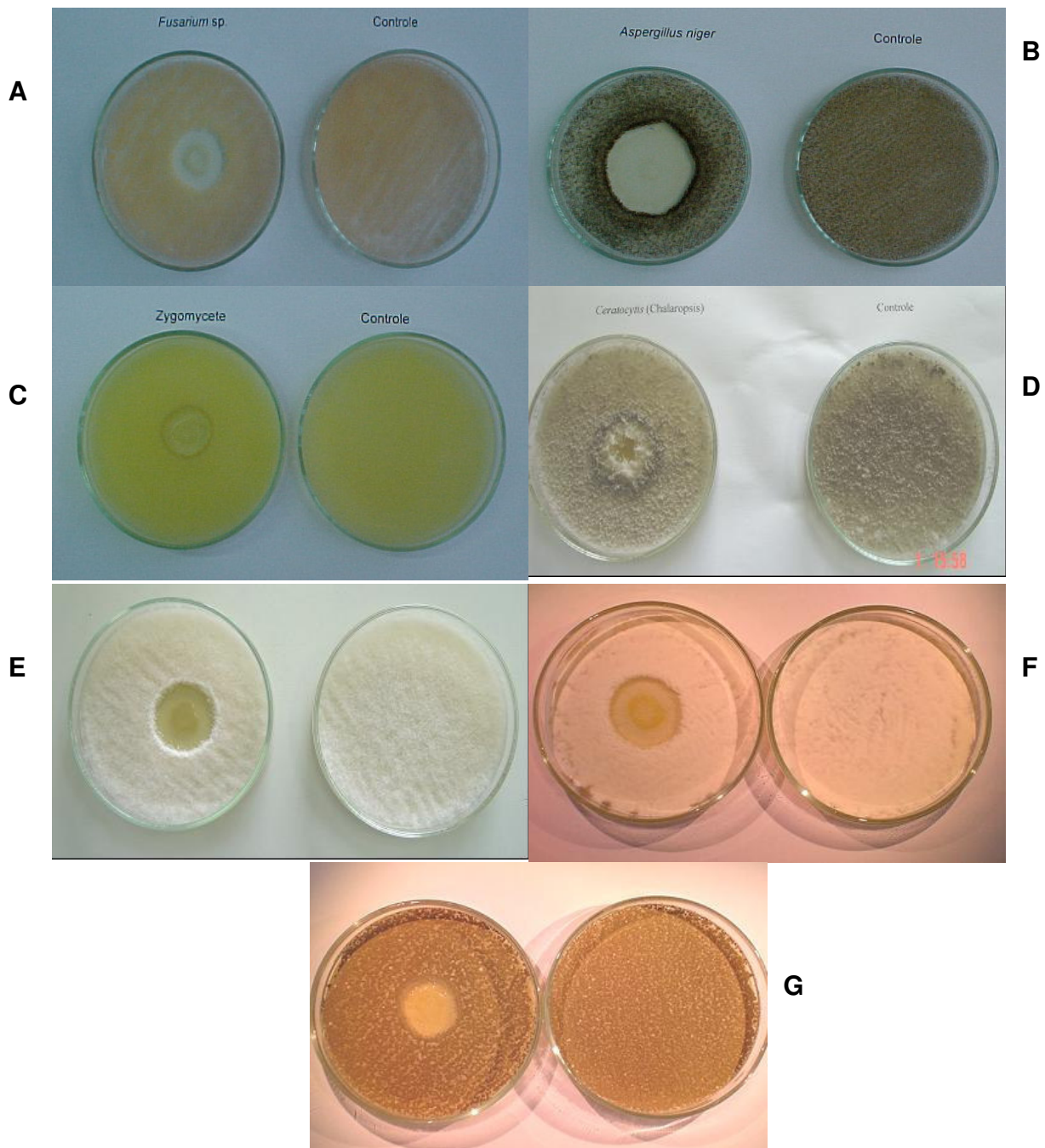


Figura 5 – Ensaio de inibição dos fungos fitopatogênicos *Fusarium sp.* (A), *Aspergillus niger* (B), *Rizophus sp.* (C), *Ceratocytis sp.* (D), *Pestalotia sp.* (E) e entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (F) e *Metarhizium anisopliae* (G) pela bactéria *B. cepacia*.

5.4) Teste de inibição da germinação de conídios de *B. bassiana* em meio líquido

Para o teste de inibição da germinação de *B. bassiana*, foram utilizados filtrados de culturas de *B. cepacia* de diferentes tempos de cultivo: 24, 48, 72, 96 e 120 h. O controle continha apenas Caldo nutriente acrescido de glicerol (2,0%).

Na figura 6 observa-se que os maiores níveis de inibição do fungo ocorreram com os extratos obtidos nos dois últimos tempos de cultivo da bactéria (96 e 120 h).

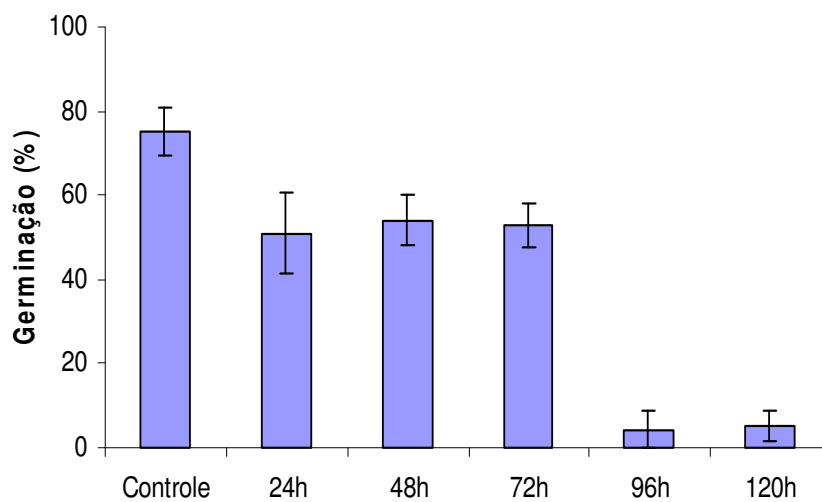


Figura 6 - Teste de inibição da germinação de conídios de *B. bassiana* em filtrados estéreis (30%) de *B. cepacia* após diferentes tempos de cultivo.

5.5) Concentração de proteínas produzidas por *B. cepacia*

Os extratos obtidos nos cinco tempos de cultivo (24-120h) foram centrifugados a 3000 rpm por 15 min, obtendo-se um sedimento (fração particulada) e um sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,22 μm), dializado com água destilada e liofilizado para concentração das proteínas. Após isso, tanto o sobrenadante, como o sedimento foram dosados pelo método de Bradford para avaliação do teor de proteínas em cada extrato. Pode-se observar que nos dois últimos tempos de cultivo (96 e 120h), tanto o sobrenadante (Fig. 7 - A), quanto o sedimento (Fig. 7 - B) apresentaram a maior concentração de proteínas.

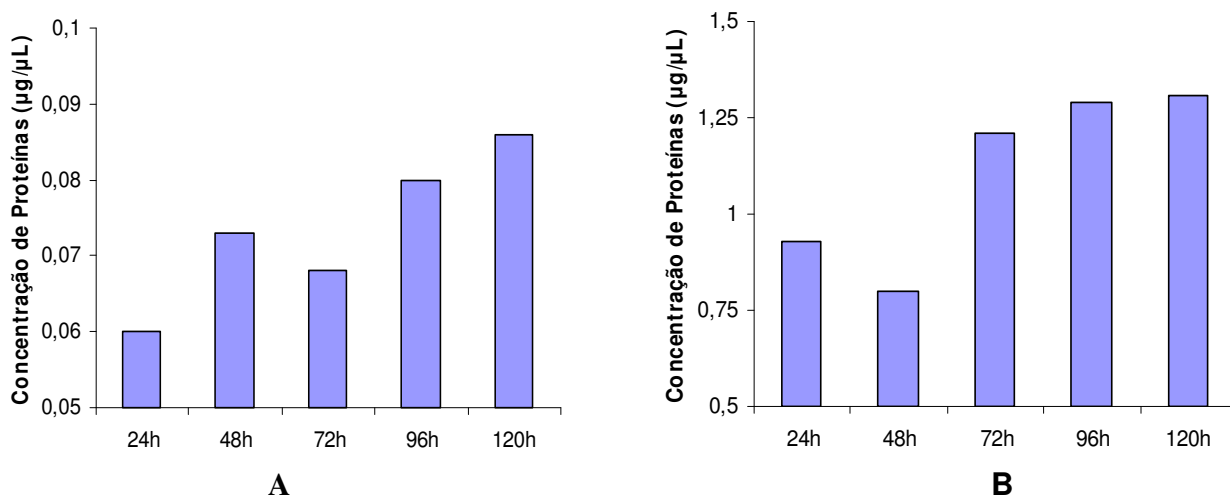


Figura 7 - Concentração de proteínas produzidas por *B. cepacia* após 24, 48, 72, 96 e 120 h de cultivo. A - sobrenadante; B - sedimento.

5.6) Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

Após a dosagem de proteínas nas amostras de sobrenadante e sedimento obtidas nos 5 diferentes tempos de cultivo, as frações foram analisadas quanto à mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida em presença de SDS. No gel do sobrenadante (figura 8 A) pode-se observar proteínas com massas moleculares em torno de 30, 43 e 94 kDa, sendo que essas proteínas estão presentes em maior quantidade nos dois últimos tempos de cultivo (96 e 120 h). Já no sedimento observa-se uma quantidade variada de proteínas com massas moleculares diferentes, o que já era de se esperar, pois o sedimento representa o extrato bruto da bactéria (figura 8 B).

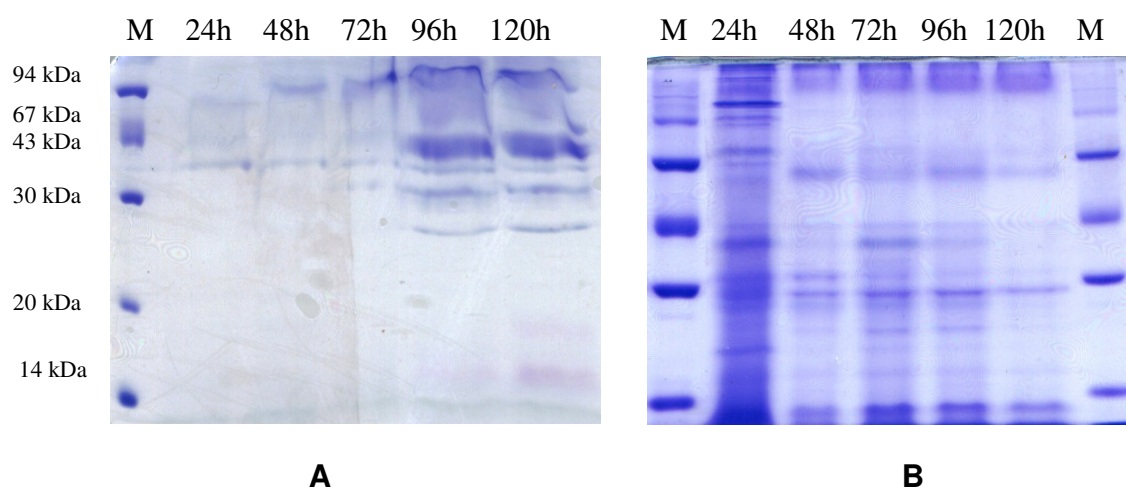


Figura 8 - Perfis eletroforéticos do sobrenadante (A) e do sedimento (B) de *B. cepacia*, nos cinco períodos de cultivo (24 – 120 h). M: marcador padrão de massa molecular.

5.7) Perfil cromatográfico das proteínas secretadas por *B. cepacia* (filtrado estéril) por cromatografia em gel filtração S-200

As proteínas secretadas por *B. cepacia* contidas no sobrenadante, conforme mostrado no item anterior (5.6) foram analisadas em uma cromatografia de gel filtração S-200, que possibilitou separação das proteínas de acordo com a massa molecular. O princípio dessa cromatografia é que as proteínas com massas moleculares maiores serão eluídas da coluna antes das proteínas menores. Assim, observa-se na figura 9 que o maior pico de proteínas encontra-se no início da cromatografia, em torno de 18 a 20 frações coletadas e, portanto são proteínas de alta massa molecular.

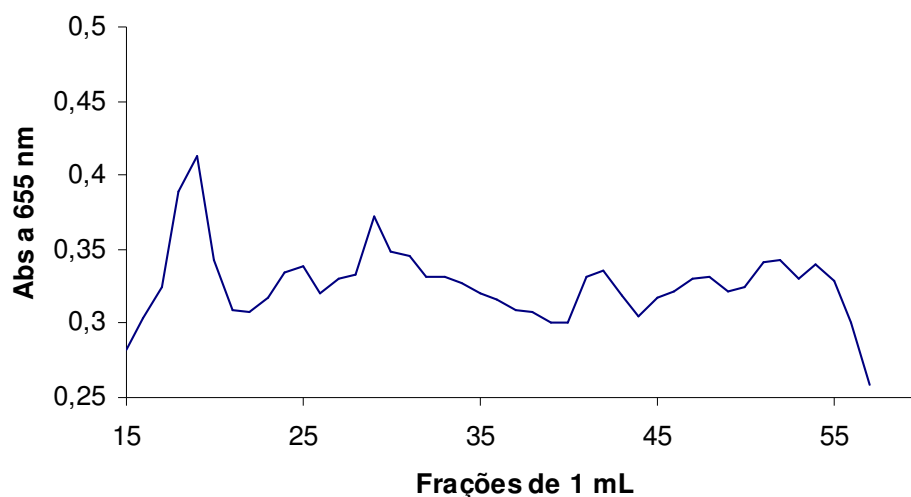


Figura 9 – Cromatografia de gel filtração S-200 das proteínas secretadas no filtrado estéril. As frações foram coletadas a 1 mL/ min e analisadas por Bradford a 655 nm. O tampão utilizado na eluição das proteínas foi o TRIS-HCl 0,5 M pH 7,0.

5.8) Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS das frações coletadas após a cromatografia em gel filtração

As proteínas coletadas na cromatografia de gel filtração foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel da figura 10 mostra proteínas de massas moleculares de 94 kDa eluídas nas frações 18, 19 e 20 e de 30 kDa eluídas nas frações 22 a 25. As proteínas purificadas em cada fração foram liofilizadas para a sua concentração e utilização em testes posteriores de inibição de microrganismos de importância veterinária.

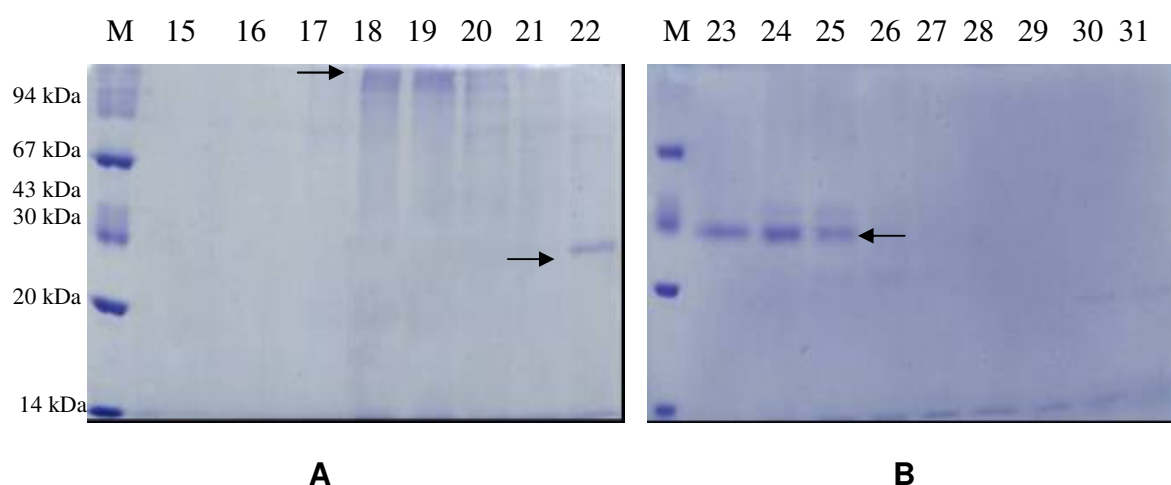


Figura 10 - Perfis eletroforéticos das frações purificadas através da cromatografia em gel filtração. Gel A: frações 15 a 22. Gel B: frações 23 a 31. M: Marcador padrão de massa molecular. As setas indicam as bandas de proteínas purificadas de acordo com sua massa molecular.

5.9) Teste de inibição de *Candida albicans* pelas proteínas purificadas na cromatografia de gel filtração

Para o teste de inibição de *C. albicans*, as proteínas obtidas após a cromatografia de gel filtração em cada fração coletada foram liofilizadas e utilizadas no teste de inibição, onde o microrganismo foi incubado por períodos diferentes de 4 a 10 h. Na figura 11 pode-se observar que as proteínas das frações 17 a 19, com massa molecular de 94 kDa, inibiram a multiplicação do microrganismo testado, pois mesmo após 10 h de incubação a densidade de células de *C. albicans* foi menor que o controle. O mesmo fato observa-se com as proteínas das frações 28 e 29, que apesar de não estarem nítidas no gel também inibiram a multiplicação de *C. albicans*. Não foi possível a identificação da massa molecular dessas proteínas, mas é provável que tenham entre 30 e 20 kDa, de acordo com o gel observado no item anterior.

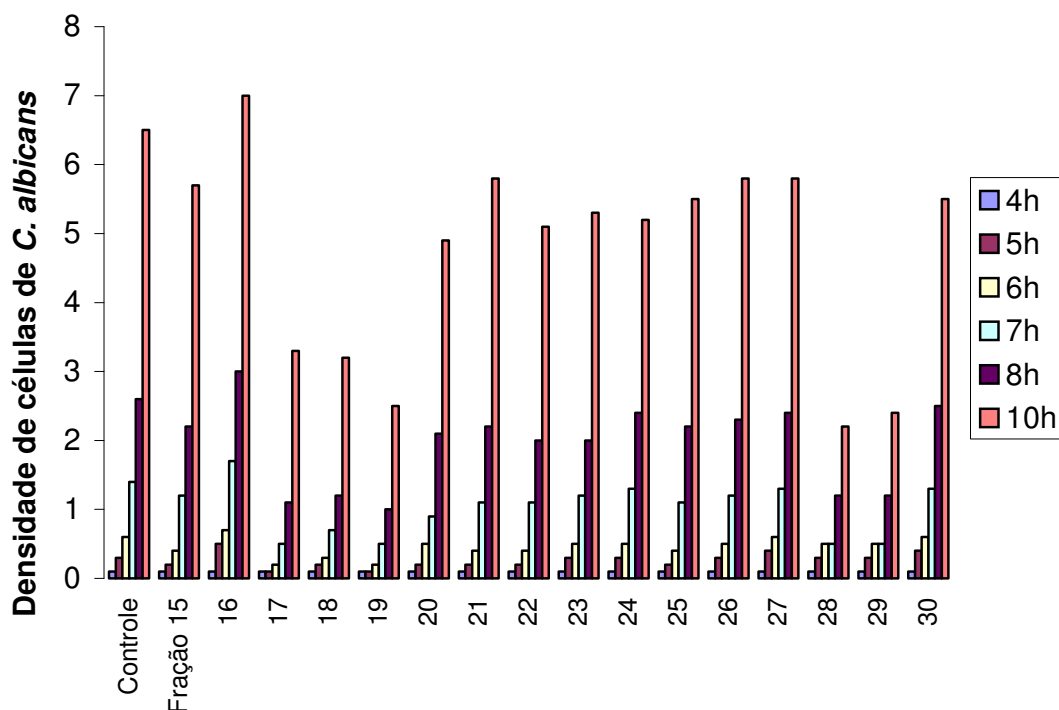


Figura 11 - Ensaio de inibição de *C. albicans* frente às proteínas secretadas por *B. cepacia* após purificação em cromatografia de gel filtração S-200.

5.10) Teste de inibição da *Prototheca sp.* por *B. cepacia*

A figura 12 demonstra a seqüência de experimentos realizados para testar a atividade de inibição da *Prototheca sp.* pelas proteínas antimicrobianas de *B. cepacia*.

Primeiramente foram feitos dois géis de poliacrilamida em presença de SDS com o extrato de proteínas secretado pela bactéria. O primeiro gel foi corado com Coomassie blue para a visualização das proteínas, e o segundo foi incubado conforme a metodologia (item 4.10) para extração das proteínas do gel e posterior incubação com a *Prototheca sp.*.

Na figura 12 A pode-se observar no gel proteínas de massa molecular de 43 e 30 kDa secretadas por *B. cepacia* (Bc) comparadas com o marcador padrão de massa molecular (M).

Na figura 12 B a densidade de células de *Prototheca sp.* foi quantificada, incubando-se o microrganismo com meio de cultura (controle do experimento), em gel sem amostra de proteínas, para testar se os componentes do gel poderiam interferir no crescimento do microrganismo (controle do gel), e com as amostras de proteínas extraídas do gel que foi cortado a cada 2 mm no sentido vertical (por exemplo a primeira tira de 2 mm do gel foi denominada amostra 1 e assim por diante). Observa-se na figura 12 B que tanto no controle do experimento como no controle do gel a *Prototheca* cresceu normalmente e que a amostra 10 foi capaz de inibir o crescimento da mesma. Essa proteína tem cerca de 30 kDa, pois comparando-se com o gel corado, a amostra 10 incide na banda de massa molecular de 30 kDa indicada pela seta. A amostra 4 também foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo, mas não foi possível a visualização de bandas protéicas no gel.

Na figura 12 C observa-se a densidade de células de *Prototheca* quando incubada com a amostra 10 após 4, 6, 8, 10 e 12 h. Observa-se que mesmo após 12 h de incubação a amostra 10 continuou inibindo o crescimento do microrganismo.

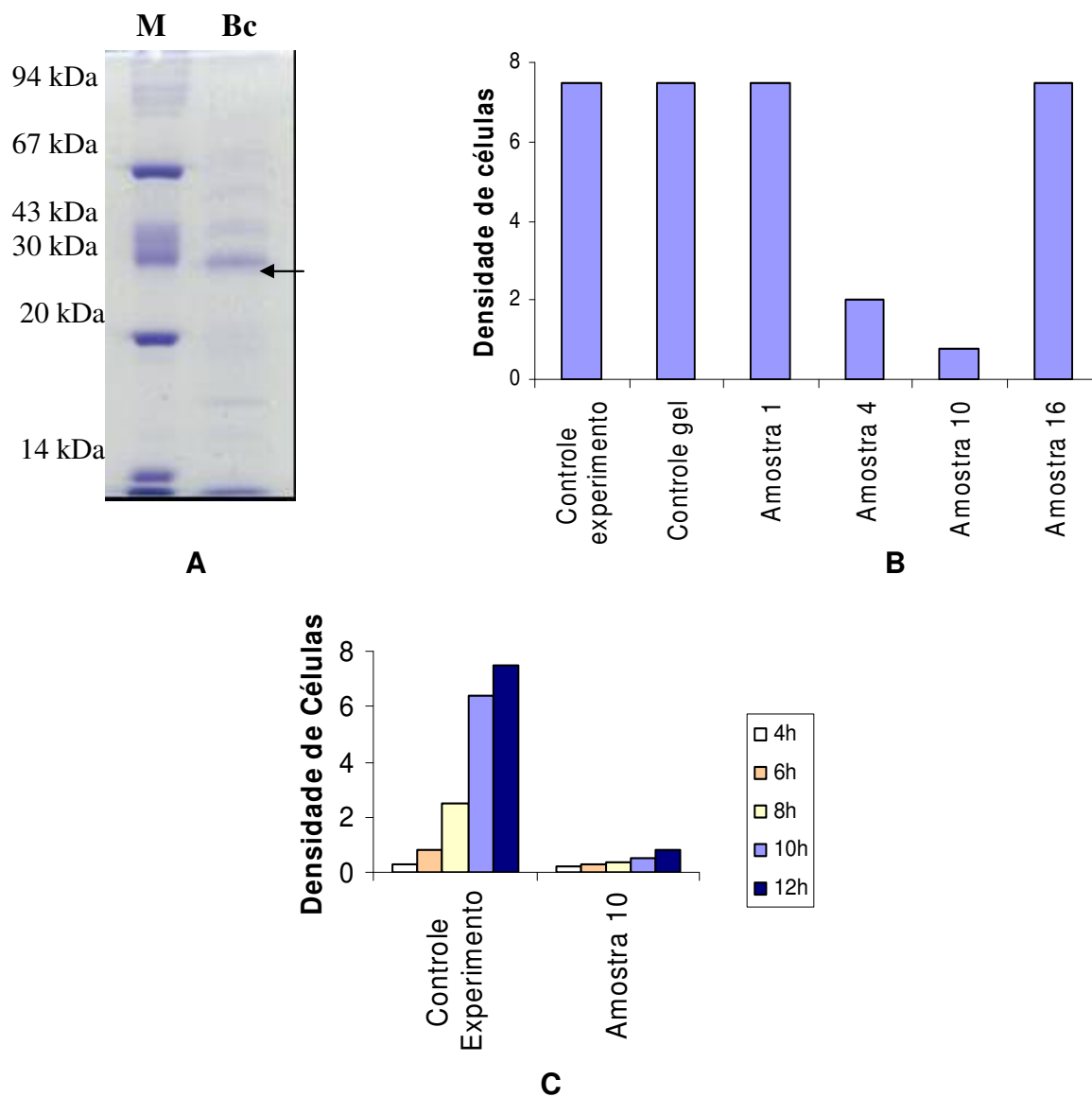


Figura 12: A – Perfil de proteínas em gel de poliacrilamida secretadas por *B. cepacia* (Bc) em relação ao marcador padrão de massa molecular (M). B – Densidade de células de *Prototheca sp.* incubadas com proteínas extraídas do gel. C – Densidade de células de *Prototheca sp.* comparando-se o controle com a amostra 10 extraída do gel.

5.11) Ensaio de germinação de conídios de *B. bassiana* com proteínas tratadas em diferentes temperaturas

Os gráficos a seguir mostram o número de conídios germinados de *B. bassiana* quando incubado com proteínas tratadas em diferentes temperaturas.

Na figura 13 A pode-se observar que quanto maior a temperatura utilizada no tratamento das proteínas maior o número de conídios germinados, devido à perda de atividade da proteína. A taxa de germinação dos conídios de *B. bassiana* foi menor que 5% quando a proteína não foi incubada previamente. Contudo, já no primeiro aquecimento (30 °C) a germinação atingiu 40%, chegando a 80% quando aquecida a 70 °C.

No gráfico B pode-se observar que o tempo de exposição da proteína em altas temperaturas interfere na atividade, pois quanto maior o tempo de tratamento da proteína a 50 °C, maior o número de conídios germinados.

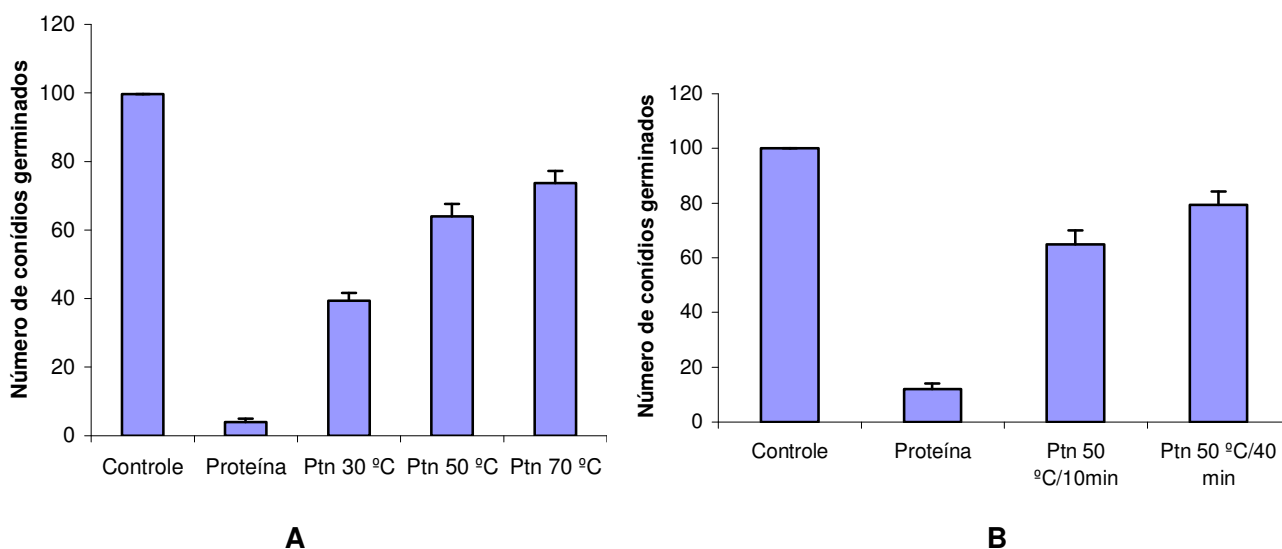


Figura 13: A – Germinação de conídios de *B. bassiana* quando incubados com proteínas sem tratamento prévio de temperatura (Proteína) e com proteína incubada a 30, 50 e 70 °C. B – Número de conídios germinados quando incubados com proteína tratada a 50 °C por 10 e 40 min.

Na figura 14 observa-se a germinação de conídios de *B. bassiana* após o teste de germinação com proteínas tratadas em diferentes temperaturas. Na figura 14A, no grupo controle (fungo+caldo nutritivo), praticamente 100% dos conídios germinaram, apresentando o tubo germinativo bem desenvolvido. Na figura 14B a proteína utilizada estava em condições ideais (logo após o seu descongelamento) e portanto observa-se que 100% dos conídios não germinaram. Na figura 14C a proteína foi tratada a 70 °C e observa-se que a atividade de inibição da germinação está bastante reduzida. Mas continuou inibindo o desenvolvimento do tubo germinativo comparando-se com o controle.

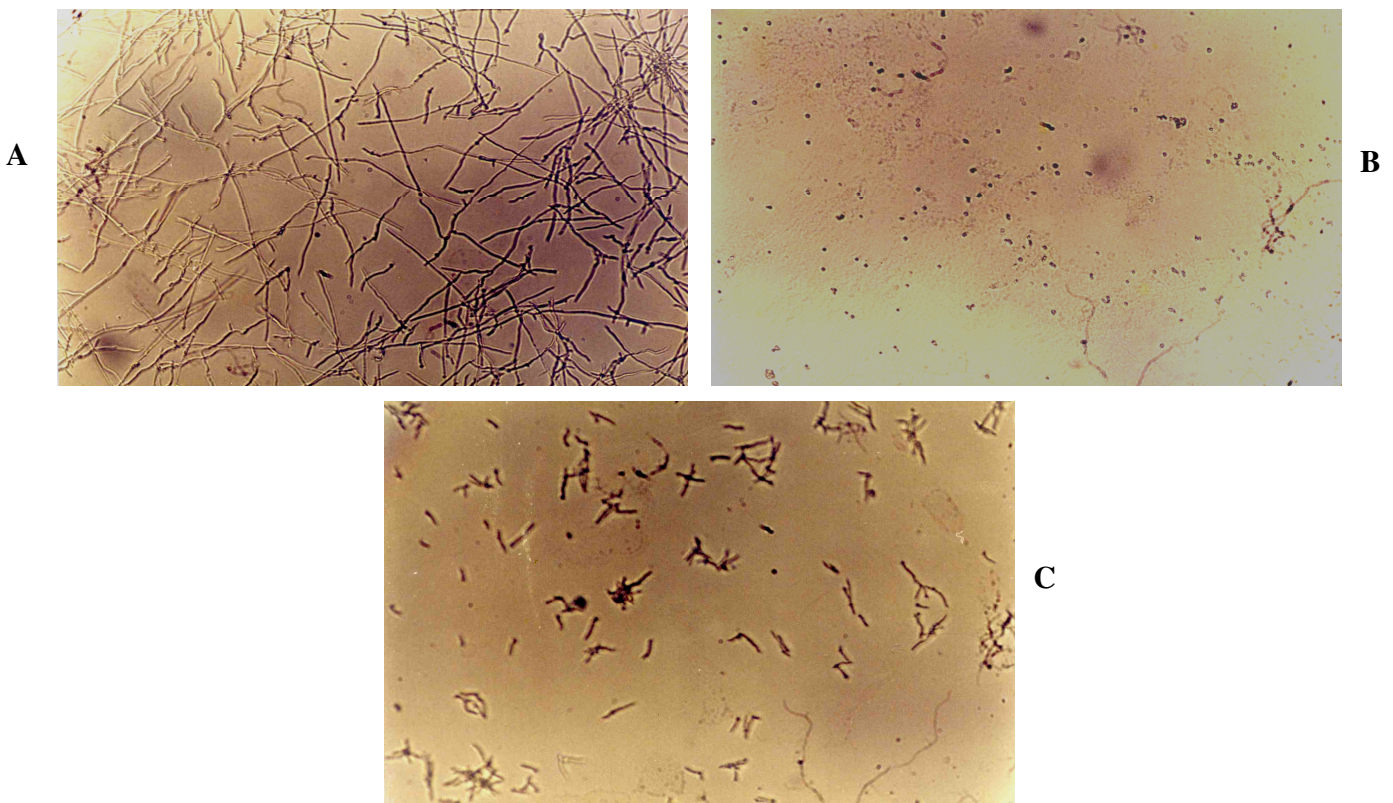


Figura 14 - Teste de inibição de conídios de *B. bassiana* quando incubados com proteínas de *B. cepacia* em diferentes tratamentos de temperatura. A – Conídios de *B. bassiana* germinados em meio de cultura (Controle). B – Conídios não germinados quando incubados com proteínas de *B. cepacia* sem tratamento prévio de temperatura. C – Conídios de *B. bassiana* incubados com proteínas tratadas a 70 °C.

6) DISCUSSÃO

A interação entre formigas cortadeiras e outros microrganismos além de seu fungo simbiote, mostra que existem relações mutualísticas mais complexas do que se imaginava. Currie *et al.* (1999) mostraram que uma bactéria classificada como *Streptomyces sp.* isolada dos corpos das formigas cortadeiras, produzia antibióticos especificamente contra o parasita especializado do formigueiro: *Escovopsis sp.*

A bactéria *Burkholderia cepacia* utilizada nesse trabalho foi isolada de ninhos de formigas cortadeiras por Santos *et al.*, (2004), sendo que anteriormente não havia nenhuma descrição na literatura sobre tal ocorrência. Essa bactéria pode ter um papel de proteção nos ninhos de *Atta sexdens*, pois foi mostrado que ela inibe os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, fato que se deve à produção de compostos com ação antifúngica.

Entre as características que fazem dessa bactéria um bom agente para o uso no controle biológico de doenças de plantas e no controle de fungos saprófitos que atacam frutos na época pós-colheita, é a capacidade de antagonismo a fungos fitopatogênicos, além disso, estão naturalmente presentes em muitas plantas cultivadas e em associação com raízes (Costa e Erabadupitiya., 2005; Smilanick *et al.*, 1993).

B. cepacia cultivada, segundo a metodologia descrita por Santos *et al.* (2004), produz antibióticos contra os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e contra os fungos fitopatogênicos como *Fusarium sp.*, *Rizophus sp.*, *Pestalotia sp.* e *Aspergillus niger*. O único fungo onde não houve a formação de halo de inibição foi o *Ceratocytis sp.* Sabe-se que a formação do halo de inibição se deve ao fato da bactéria secretar compostos para o meio extracelular. Com isso conclui-se que os compostos antibióticos secretados por *B. cepacia* sejam eficazes contra todos os fungos testados com exceção de *Ceratocytis sp.*

Um estudo mostrou que *Burkholderia sp.* isolada do solo inibiu o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Aspergillus niger* e a inibição ocorreu tanto na presença da bactéria como na presença do extrato filtrado e pasteurizado, indicando que uma porção da atividade antimicrobiana é devido a excreção de componentes extracelulares (Cain *et al.*, 2000). Com isso, é possível que *B. cepacia* utilizada nesse trabalho também secrete para o meio extracelular os componentes antibióticos.

Até o momento existe na literatura a descrição de compostos antibióticos produzidos por *B. cepacia* classificados como peptídeos, como a xilocandina e a cepacidine A, eficazes contra uma grande variedade de fungos (Meyers *et al.* 1987, Lee *et al.* 1994), mas não existem relatos sobre a produção de proteínas antimicrobianas por essa bactéria.

Para elucidação da natureza dos compostos antibióticos protéicos foram feitos géis de eletroforese SDS-PAGE para visualizar a produção de proteínas secretadas durante o cultivo em meio líquido. Após 96 e 120 h de cultivo da bactéria a produção de proteínas secretadas atingiu o seu maior pico. O perfil de proteínas nos últimos dois tempos de cultivo (96 e 120 h) mostrou 6 bandas majoritárias com massas moleculares entre aproximadamente 30 a 90 kDa. Em comparação com o gel dos perfis de proteínas extraídas da fração celular pode-se observar a maior diversidade de proteínas nas células depois de 24 h de cultivo, e variados perfis nas outras frações. Entretanto, como o interesse foi de investigar as proteínas secretadas, outros experimentos não foram feitos com os extratos celulares de *B. cepacia*.

O experimento para investigar a produção de compostos antifúngicos secretados no meio líquido mostrou o maior nível de inibição da germinação de conídios de *B. bassiana* pelas frações de filtrados de meio cultivo de 96 e 120 h de cultivo.

Um dos compostos produzidos por *B. cepacia*, a pirrolnitrina (um derivado de fenilpirrole), é armazenado no interior das células, sendo liberado para o meio de cultivo somente no final da fase estacionária. O caldo nutriente acrescido de glicerol (2%) foi a fonte de carbono que melhor estimulou a produção de pirrolnitrina nos estudos de El-Banna e Winkelmann (1998). O meio proposto por Lee *et al.* (1994) visa à produção de cepacidina A, um glicopeptídeo.

A partir da hipótese que as frações protéicas de *B. cepacia* (isolado 2b) poderiam ser responsáveis pela inibição dos fungos testados, foram feitos experimentos para verificar a atividade das proteínas visualizadas nos géis e realizar a caracterização das proteínas usando cromatografia de filtração em gel, com o intuito de purificar tais proteínas. Foram realizadas duas abordagens, a análise das proteínas separadas usando a coluna de cromatografia como auxílio de SDS-PAGE para a visualização das proteínas e o ensaio das frações cromatográficas para atividade inibitória contra um microrganismo de importância veterinária *Candida albicans*. Também foi utilizado um outro microrganismo de importância veterinária *Prototheca zopffi* para testes de inibição pelos extratos protéicos de *B. cepacia*. A multiplicação de *C. albicans* foi inibida por proteínas de alta massa molecular secretadas pela bactéria. Sabe-se que alguns compostos já descritos na literatura como, por exemplo, as cepafunginas I, II e III classificadas como peptídeos inibem o crescimento de *C. albicans* (Shoji *et al.*, 1989). Já no teste de inibição da *Prototheca* sp. a proteína antimicrobiana foi coincidente com a banda de 30 kDa como visto no gel de eletroforese.

Para testar se a temperatura afeta a atividade inibitória das proteínas foram realizados testes com tratamentos a 30, 50 e 70 °C. Foi observado que a temperatura de 30 °C interferiu na sua atividade mostrando que tais proteínas são altamente sensíveis a temperaturas médias e altas. Após a incubação a 50 e 70 °C, o teste de inibição de *B. bassiana* mostrou que o número de conídios

germinados é elevado, mas esses não conseguem ter um desenvolvimento normal, verificado pelo tamanho do tubo germinativo que ficou bastante reduzido, assim parte da ação antifúngica é perdida, mas a ação fungistática permanece mesmo após incubação a 70 °C. Os peptídeos previamente isolados de *B. cepacia*, por exemplo, cepacidina A, tem estabilidade entre 210 e 214 °C (Lee *et al.*, 1994).

O fato dos compostos de *Burkholderia* terem inibido uma ampla faixa de fungos patogênicos é uma característica extremamente importante. Os compostos desta bactéria podem proteger a colônia de uma maior gama de patógenos. *B. cepacia* pode complementar a ação de *Streptomyces* sp. que, conforme proposto por Currie *et al.* (1999), visa proteger a colônia do ataque de *Escovopsis* sp. Provavelmente, colônias jovens, ainda com poucos indivíduos, não dispõem da proteção do actinomiceto, o que pode ser complementado pela ação destas bactérias. Os diferentes estágios de desenvolvimento da colônia podem apresentar diferenças na dinâmica da comunidade microbiana associada.

Como os compostos de *B. cepacia* também inibiram leveduras de importância veterinária como *C. albicans*, estes podem ser considerados para um futuro uso no tratamento de doenças causadas por *C. albicans*. As otomicoses nos animais domésticos podem ser causadas por leveduras incluindo *C. albicans*. A necessidade de desenvolvimento de novas terapias contra diferentes agentes patogênicos é cada vez maior, frente a uma pressão natural exercida sobre os microrganismos pelo uso freqüente de antibióticos no tratamento de doenças em animais. Atualmente, há uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias novas relacionadas a uma diversidade de agentes patogênicos. Alguns microrganismos revelam um enorme potencial a ser explorado pela indústria de medicamentos por produzirem substâncias de ação antifúngica, como as bactérias do gênero *Burkholderia* que, em cultivos *in vitro*, produzem e secretam subprodutos de seu metabolismo de comprovada atividade inibitória do crescimento de fungos. Estes estudos da atividade inibitória sobre tais leveduras patogênicas são de interesse médico e veterinário e demonstram o potencial

promissor dos metabólitos de *Burkholderia* como alternativa no tratamento de infecções causadas por fungos em animais domésticos e humanos.

7) CONCLUSÕES

- ❖ *B. cepacia* inibiu o crescimento dos fungos entomopatogênicos testados (*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*);
- ❖ *B. cepacia* inibe também os fungos fitoparasitas: *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*, *Rizophus sp.*, *Pestalotia sp.*, mas não inibe o fungo *Ceratocystis sp.*;
- ❖ O perfil de proteínas secretadas por *B. cepacia* mostra bandas com massas moleculares variadas. Em 120 h de cultivo a concentração de proteínas é maior assim como a capacidade de inibir o fungo *B. bassiana*;
- ❖ A atividade inibitória contra *Prototheca zopfii* está associada a proteínas de aproximadamente 30 kDa;
- ❖ Após a cromatografia em gel filtração, o gel SDS-PAGE mostrou que existem bandas de alta massa molecular secretadas por *B. cepacia* que possuem atividade contra *C. albicans*;
- ❖ A atividade inibitória da proteína foi afetada nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C. Na temperatura de 70 °C os conídios germinaram, mas não houve crescimento normal das hifas.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A., NELSON, J. M., ROSSITER, S. e ANGULO, F. J. Public health consequences of use antimicrobial agents in food animals in the United States. **Microbial drug resistance** v. 9, n. 4, p. 373-379. 2003.

BEN-ZIONY, Y. e ARZI, B. Use of lufenuron for treating fungal infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 217, n. 10, p. 1510-1513. 2000.

BEVIVINO, A., SARROCCO, S., DALMASTRI, C., TABACCHIONI, S., CANTALE C. e CHIARINI L. Characterization of free-living maize-rizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology** v. 27, n. 3, p. 225-237. 1998.

BEVIVINO, A., PEGGION, V., CHIARINI, L., TABACCHIONI, S., CANTALE, C. e DALMASTRI, C. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated

Burkholderia cenocepacia populations **Research in Microbiology** v. 156, n. 10 p. 974-983. 2005.

BLUM, H., BIER, H. e GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis** v. 8, p. 93-99. 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254. 1976.

CHERRETT, J.M. The biology, pest status and control of leaf-cutting ants. **Agric. Zool. Rev.** v. 1, p. 1-27. 1986.

CORBELLINI, L.G, DRIEMEIER, D., CRUZ, C., DIAS, M.M. e FERREIRO, L. Bovine Mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, Epidemiological and Pathological Aspects in a Brazilian Dairy Herd. **Tropical Animal Health and Production** v. 33, n. 6, p. 463-470, .2001.

COSTA, D.M. e ERABADUPITIYA, An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. **Postharvest Biology and Technology.** v. 36, n. 1, p. 31-39. 2005.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 55, p. 357-380. 2001.

CURRIE, C.R., BOT, A.N.M. e BOOMSMA, J.J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos** v. 101, p. 91-102. 2003.

CURRIE, C.R., SCOTT, J.A., SUMMERBELLS, R.C. e MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature** v. 398, p. 701-704. 1999.

CURRIE, C.R. e STUART, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 22, p. 268. 2001.

EL-BANNA e WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology** v. 85, p. 69-78. 1998.

ERRAMPALLI, D. e BRUBACHER, N.R. Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. **Biological Control**. v. 36, n. 1, p. 49-56. 2006.

FLEMING, ALEXANDER. Encyclopedia Britannica Online. <http://www.britannica.com/eb/article-9034537> em 7/04/06.

JANISIEWICZ, W. *Pseudomonas syringae* (saprophytic strain) and "Fruit Yeasts" Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/> em 10/03/07.

KRUKOWSKI, H., TIETZE, M., MAJEWSKI, T. e ROZANSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region **Poland. Mycop.** v. 150, n. 1, p. 5-7. 2001.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, p. 680-685. 1970.

LANDA A. S., MARIJN S., JAN W., ANTONIE A. C. M., JAN D. e DICK B. Cometary Degradation of Trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in a

Chemostat with Toluene as the Primary Substrate. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 60, n. 9, p. 3368-3374. 1994.

LANGONI, I.I., DOMINGUES, P.P., SILVIA, R.T., TAVARES, H.L., MOTA, R.A., ROCHA, N.S. e SFORCIN, A. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: Clínica e terapêutica. IV Anais Cong. Iberolatinoamer. de Apicultura, Buenos Aires, p. 219-222. 1994.

LEE, C.H., KIM, S., HYUN, B., SUH, J.W., KIM, C.Y.C., LIM, Y. e KIM, C. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. **J. Antibiotics** v. 47, p. 1402-1405. 1994.

MAHENTHIRALINGAM, E., BISCHOF, J., BYRNE, S. K., RADOMSKI, C., DAVIES, J. E., AV-GAY, J. e VANDAMME, P. DNA - based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3165–3173. 2000.

MEYERS, E., BISACCHI, G.S., DEAN, L., LIU, W.C., MINASSIAN, B., SLUSARCHYK, D. S., SYKES, R. B., TANAKA, S. K. e TREJO, W. Xylocandin: A new complex of antifungal peptides. I. Taxonomy, Isolation and Biological Activity. **The Journal of Antibiotics**. v. 40, p. 1515-1519. 1987.

MORETTI, A., PASQUALI, P., MENCARONI, G., BONCIO, L. e PIERGILI FIORETTI, D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (Yeasts and bacteria). **Zent. Veter. B.** v. 45, n. 3, p. 129-132. 1998.

MUELLER, U.G., SCHULTZ, T. R., CURRIE, C. R., ADAMS, R.M.M. e MALLOCH, D. The origin of the Attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, v. 76, p. 169-197. 2001.

NIELSEN T.H., CHRISTOPHERSEN C., ANTHONI U. e SORENSEN J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, p. 80-90. 1999.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences** v. 12, p. 357-358. 1996.

PARKE, J. L. e GURIAN- SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Ann. Rev. Phytopathol.** v. 39, p. 225-58. 2001.

PARKER, W.L., RATHNUM, M.L., SEINER, V., TREJO, W. H., PRINCIPE, P.A. e SYKES, R. B. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Antibiotics**. v. 37, p. 431- 440. 1984.

PEIX A., MATEOS, P.F., RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MARTINEZ-MOLINA, E. e VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris*) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry** v. 33, p. 1927-1935. 2001.

PFALLER, M.A., JONES, R.N., MESSER, S.A., EDMOND, M.B. e WENZEL, R.P. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. **Diagn. Microbial. Infect Dis.** v. 31, n. 1, p. 327-32. 1998.

POULSEN, M., BOT, A.N.M., CURRIE, C.R., NIELSEN, M.G. e BOOMSMA, J.J. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology** v. 17, p. 260-269. 2003.

RAAIJMAKERS, J. M., VLAMI, M. e SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leuwenhaeck** v. 81, p. 537-547. 2002.

RIBEIRO, M.G., LANGONI, H., SILVEIRA, A.M. e RUFFINO, S.M. Mastite Bovina por *Prototheca zopfii*. **Biológico** v. 60, n.1, p.1-7. 1998.

ROBERTS, D. P., LOHRKE, S.M., MEYER, L.F.M., BUYER, J.S., BOWERS, J.H., BAKER, J., LI, W., SOUZA, J.T., LEWIS, J. A. e CHUNG, S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression soilborne diseases of cucumber. **Crop Protection**. v. 24, n. 2. p. 141-155. 2005.

SANTOS, A. V. Bactérias associadas à formiga saúva *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) e seus efeitos sobre fungos entomopatogênicos: uma nova abordagem para estratégias de controle biológico. 2003. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Brasil. 2003.

SANTOS, A.V., DILLON, R. J., DILLON, V. M., REYNOLDS, S. E. e SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 239, n. 2, p. 319-323. 2004.

SCHMIDBERGER, J.W., TSANG, J.S.H. e WILCE, M.C.J. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of DehIVa, a dehalogenase from *Burkholderia cepacia* MBA4. **Acta Cryst.** V. 61, p. 271-273. 2005.

SHOJI, J., HINOO, H., KATO, T., HATTORI, T., HIROOKA, K., TAWARA, K., SHIRATORI, O. e TERUI, Y. Isolation of cepafunginas I, II and III from *Pseudomonas* species. **The Journal of Antibiotics.** v. 43, p. 784-787. 1989.

SFALANGA, A., CELLO, F., MUGNAI, L., TEGLI, S., FANI, R. e SURICO, G. Isolation and characterization of a new antagonistic *Burkholderia* strain from the rhizosphere of healthy tomato plants. **Research in Microbiology** v. 150, n. 1, p. 45-59. 1999.

SMILANICK, J.L., DENIS-ARRUE, R., BOSH, J.R., GONSALEZ, A.R., HENSON, D. e JANISIEWICZ, W.J. Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. **Crop Protection.** v. 12, p. 129-134. 1993.

VIEIRA-DA-MOTTA, O., MEDINA-ACOSTA, E., ALMEIDA, C.M.C., KIPNIS, T.L. e DIAS DA SILVA, W. Development of anti-*Staphylococcus aureus* enterotoxins antibodies in chickens and their purification from yolk. **Scand. J. of Immun., Supp.** v. 54, p. 28-28. 2001.

WALKER, R., INNES, C. M. J. e ALLAN, E.J. The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 346-348. 2001.

Waksman, S. A. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? **Mycologia** V. 39, N. 5, p. 565-569. 1947.

WEBER, N.A. The fungus culturing behavior of ants. **Am. Zoo.** v. 12, p. 577-587. 1972.