



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Ultraestrutura e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal

Danilo de Andrade Cavalcante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlene Teixeira De-Souza
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Freitas

Brasília, 2014.

Agradecimentos

À Thais Torres, pelo incentivo, paciência, dedicação e principalmente, por estar sempre presente.

À minha mãe, Abigail e ao meu pai, Djalma, por todo o amparo, paciência e ensinamentos inestimáveis.

Às minhas colegas de laboratório, Juliana e Flávia, pelas discussões relevantes e por todo suporte com o trabalho. Agradeço também por contribuírem para tornar o nosso laboratório um lugar onde é tão agradável trabalhar.

Ao professor Adam Driks, pela contribuição direta e essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também aos professores Bergmann Morais Ribeiro e Sônia Nair Bão por disponibilizarem as instalações para elaboração do gradiente de sacarose e microscopia eletrônica de transmissão respectivamente.

Agradeço ainda aos doutores Luciano Paulino da Silva, Claudio Afonso Pinho Lopes Lopes e Amanda Souza Coelho, pela ajuda e disponibilidade imprescindíveis.

Agradeço à minha co-orientadora, professora Sonia Maria Freitas, por toda a disponibilidade, palavras de incentivo, ideias e discussões fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, especialmente, à minha orientadora, professora Marlene Teixeira De-Souza, pelas “caixas” para carregar, pelas incontáveis horas de dedicação e discussões indispensáveis para este trabalho como um todo, pela paciência, pelos conselhos sempre proveitosos e, sobretudo, pela amizade.

Sumário

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
I - Introdução	1
1 - Filo Firmicutes	1
2 - Bactérias aeróbias formadoras de endósporos	2
2.1 - Esporo	4
2.1.1 - Estágios da esporulação	7
2.1.2 - Estágio 0: célula pré-divisional	9
2.1.3 - Estágio I: filamento axial	9
2.1.4 - Estágio II: formação do septo	9
2.1.5 - Estágio III: engolfamento	10
2.1.6 - Estágio IV: córtex	11
2.1.7 - Estágio V: formação da capa	11
2.1.8 - Estágio VI: maturação do esporo	15
2.1.9 - Estágio VII: lise celular	17
2.2 - Germinação	17
2.3 - Mecanismos de resistência	18
2.4 - O gênero <i>Bacillus</i>	22
3 – Bactérias aeróbias formadoras de endósporo de solo	24
4 - Potencial biotecnológico e riscos associados à Bafes	26
5 - Taxonomia fenotípica	27
II - Justificativa	30

III - Objetivos	32
1. Objetivos específicos	32
IV - Material e Métodos	33
1. Coleta de amostras de solo	33
2. Meios de cultura	33
3. Isolamento e estoque de esporos	33
4. Linhagens e crescimento	34
5. Propriedade tintorial	34
6. Ensaio de atividade hemolítica	34
7. Purificação de biomoléculas	34
8. Seleção de bandas por gradiente de sacarose	35
9. Fluorescência	35
10. Perfil eletroforético de proteínas	36
11. Espectrometria de massa por MALDI-TOF	36
12. Ultraestrutura de esporos e cristais	36
13. Purificação e análise de proteínas de capa de esporo	37
14. Análise de termorresistência de esporos	37
V - Resultados e Discussão	38
1. Coleta e isolamento de linhagens SDF	38
2. Perfil de biomoléculas de culturas de Bafes em final de esporulação	48
3. Ultraestrutura de esporos por microscopia eletrônica de transmissão	71
4. Composição protéica de capa de esporos de linhagens SDFs	73
5. Termorresistência de esporos de linhagens SDFs	85
VI - Conclusão e perspectivas	87
VII - Referências bibliográficas	89

Lista de abreviaturas

Bafes – Bactérias aeróbias formadoras de endósporo

DF – Distrito Federal

LaBafes – Laboratório de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo

MCF – Microscopia de contraste de fase

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

%G+C – Percentual de Guanina e Citosina no DNA

DPA-Ca²⁺ – Ácido piridina-2,6-dicarboxílico e cátions divalentes associados

SASPs – Pequenas proteínas ácido solúveis

PC – Parede Celular

PG – Peptídeo Glicano

SDF – Solo do Distrito Federal

UV – Ultravioleta

mL – Mililitro

kDa – Kilodalton

UFC – Unidade formadora de colônia

MALDI-TOF – Ionização e dessorção à laser assistidos por matriz-tempo de voo

Lista de figuras

Figura 1. Microscopia de contraste de fase de células em esporulação	3
Figura 2. Modelo representativo de pré-esporos em diferentes esporângios	4
Figura 3. Ciclo celular	6
Figura 4. Ultraestrutura de esporos	7
Figura 5. Representação modular da arquitetura da rede de regulação do processo de esporulação em <i>B. subtilis</i>	8
Figura 6. Proteínas de capa de esporo de <i>B. subtilis</i>	13
Figura 7. Redes de interações protéicas de ultraestrutura de esporos de <i>B. subtilis</i>	14
Figura 8. Estruturas externas de esporos	16
Figura 9. Ácido dipicolínico	20
Figura 10. Perfil de biomoléculas de culturas de Bafes em final de esporulação	49
Figura 11. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	54
Figura 12. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	55
Figura 13. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	56
Figura 14. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	57
Figura 15. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	58
Figura 16. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	59
Figura 17. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	60
Figura 18. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	61
Figura 19. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	62
Figura 20. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	63
Figura 21. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	64
Figura 22. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	65
Figura 23. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	66
Figura 24. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose	67
Figura 25. Fluoróforos identificados em bandas coletadas de gradiente de sacarose	68
Figura 26. Fluoróforos identificados em bandas coletadas de gradiente de sacarose	69
Figura 27. Fluoróforos identificados em bandas coletadas de gradiente de sacarose	70

Figura 28. Análise de esporo da linhagem SDF0001	76
Figura 29. Análise de esporo da linhagem SDF0002	76
Figura 30. Análise de esporo da linhagem SDF0005	77
Figura 31. Análise de esporo da linhagem SDF0007	77
Figura 32. Análise de esporo da linhagem SDF0008	78
Figura 33. Análise de esporo da linhagem SDF0009	78
Figura 34. Análise de esporo da linhagem SDF0011	79
Figura 35. Análise de esporo da linhagem SDF0012	79
Figura 36. Análise de esporo da linhagem SDF0015	80
Figura 37. Análise de esporo da linhagem SDF00021	80
Figura 38. Análise de esporo da linhagem SDF0024	81
Figura 39. Análise de esporo da linhagem SDF0029	81
Figura 40. Análise de esporo da linhagem SDF0030	82
Figura 41. Análise de esporo da linhagem SDF0042	82
Figura 42. Análise de esporo da linhagem SDF0047	83
Figura 43. Análise de esporo da linhagem SDF0049	83
Figura 44. Análise de esporo da linhagem FT9	84

Lista de tabelas

Tabela I. Linhagens SDFs isoladas e caracterizadas durante este trabalho	40 a 43
Tabela II. Origem geográfica das amostras de solo utilizadas neste trabalho	46
Tabela III. Características fenotípicas de linhagens da SDF selecionada para análises completares	47
Tabela IV. Termorresistência de esporos de linhagens SDFs analisadas neste estudo	86

Resumo

O solo é considerado o maior reservatório de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes). Essas linhagens apresentam importância microbiológica e potencial biotecnológico em diversas áreas como a médica, agrícola, ecológica e de biodefesa. As Bafes estão distribuídas taxonomicamente dentro do filo *Firmicutes*, que abriga bactérias, em maioria, Gram positivas, com baixo conteúdo G+C e parede celular muito rígida. De um modo geral, o conhecimento atual sobre essas bactérias é limitado as espécies modelo, notadamente, o *Bacillus subtilis*, em adição aos *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*. Estudos clássicos envolvendo esporos bacterianos investigados por microscopia eletrônica de transmissão revelaram a complexa ultraestrutura destas células. Essas características estruturais motivaram investigações para compreender como a estrutura é montada de modo a resultar no dispositivo celular mais resistente conhecido. Esses dados possibilitaram direcionar estudos evolutivos relacionados com as diferenças fenotípicas em um tipo celular supostamente preparado para resistir a estresses ubíquos, tanto de natureza física, quanto química. Durante este trabalho, o número de linhagens ambientais da Coleção de Bafes (CBafes) do Laboratório de Microbiologia/LaBafes da UnB foi ampliada em 125 linhagens e avaliada quanto a diversidade. Os esporos de dezenove linhagens de solo do DF (SDF) e a linhagem de *Bacillus spp.* FT9, também, parte do acervo, foram caracterizadas quanto à ultraestrutura, por microscopia eletrônica de transmissão e termorresistência, por calor úmido. Biomoléculas, como peptídeos e proteínas, produzidas durante o ciclo celular dessas linhagens também foram identificadas e analisadas quanto ao grau de pureza, por análises espectroscópicas e espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os resultados obtidos, embora preliminares, reforçam a diversidade presente nas linhagens da CBafes, não somente dentro de uma visão taxonômica, como também quanto ao potencial de exploração biotecnológica e abertura para várias linhas de pesquisa.

Abstract

Soil is considered the greatest aerobic endospore-forming bacteria (Aefbs) reservoir. These lineages present microbiological importance and biotechnological potential in diverse fields such as medical, agricultural, ecological and biodefense. Aefbs are widely distributed within the phylum *Firmicutes*, which houses mainly Gram-positive bacteria, presenting low G+C content, and rigid cell wall. Generally, the current knowledge regarding these species is limited to some model lineages, notably, *Bacillus subtilis* in addition to *B. cereus*, *B. thuringiensis*, and *B. anthracis*. Classic studies involving bacterial spores investigated by transmission electron microscopy revealed the complex ultrastructure of these cells. These structural characteristics have motivated investigations to understand how this structure is assembled to result in the most resistant living cell ever known. These data impelled evolutionary studies related to phenotypic diversions in a cell type supposed to be prepared to resist to both physical and chemical ubiquitous stresses. During this work the number of environmental lineages within the Aefbs Collection (CBafes) from the Aefbs Laboratory' (LaBafes UnB) was increased by 125 lineages and assayed for diversity. Spores from nineteen selected DF soil lineages (SDFs) and the *Bacillus spp.* lineage FT9 were further investigated regarding ultrastructure, by transmission electron microscopy and thermoresistance, by wet-heat. Biomolecules such as peptides and proteins produced during SDFs cell cycles were also identified and inspected concerning the degree of purity, by spectroscopy analysis and mass spectrometry (MALDI-TOF). Though preliminary, these results enhance the knowledge on the diversity presented by the SDF lineages both from a taxonomic view and regarding the biotechnological potential. Taken together these data represent a whole new research line in the spore-forming biology.

I Introdução

1 - Filo *Firmicutes*

O filo *Firmicutes* foi originalmente proposto para incorporar todas as bactérias Gram positivas (Gibbons e Murray, 1978), enquanto o filo *Proteobacteria* abrigaria as Gram negativas (Stackebrandt *et al.*, 1988). Posteriormente, o percentual de Guanina e Citosina (Taxa G+C, ou %G+C, no DNA) foi utilizado como ferramenta taxonômica para dividir o filo em três classes: i) *Clostridia* e ii) *Bacilli*, que se coram como Gram positivas e apresentam baixo %G+C (geralmente <50%) e iii) *Mollicutes*, que se coram Gram positivas ou Gram negativas e apresentam alto %G+C (de Vos *et al.*, 2009; Schleifer, 2009). Atualmente, a classe *Mollicutes*, tendo se demonstrado por várias vezes fenotípica e filogeneticamente muito diferente do típico encontrado em um *Firmicutes*, foi realocada para o filo *Tenericutes* (de Vos *et al.*, 2009; Schleifer, 2009). Permanecem no filo *Firmicutes*, além das duas grandes classes *Clostridia* e *Bacilli*, apenas alguns membros filogeneticamente relacionados aos *Mollicutes*, os *Erysipelotrichia* que compõem a terceira classe do filo e a classe *Negativicutes*, filogeneticamente relacionados à classe *Clostridia* que, entretanto, se coram como Gram negativas.

Trata-se de um filo fenotipicamente diversificado (Garrity, 2003; Fritze, 2004; de Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Galperin, 2013) que consiste de 26 famílias e 255 gêneros de bactérias com parede celular (PC) rígida, tipicamente composta por ácido murâmico, podendo, também, apresentar ácido teicóico (de Vos *et al.*, 2009; Schleifer, 2009). Os representantes desse filo apresentam células nas formas esféricas, bastões, curvadas e helicoidais ou filamentosas, e podem ou não apresentar flagelo. Algumas linhagens são aeróbias, facultativas ou anaeróbias estritas e parte é termófila e/ou halófila. Apesar de a maioria ser quimio-organotrófica, alguns membros são fotoheterotróficos anoxigênicos. O crescimento ótimo, *in vitro*, da maioria das espécies se dá em pH neutro, mas também já foram descritas espécies acidófilas ou alcalífilas.

A habilidade de formar endósporos (deste ponto para frente designados apenas como esporos) tem sido uma característica definitiva para o filo *Firmicutes* desde as descrições das primeiras de Ferdinand Cohn e Robert Koch em 1876 (Fritze, 2004; Logan e de Vos, 2009). Esta característica marcante, apesar de observada em várias linhagens, tanto aeróbias quanto anaeróbias, não constitui uma característica universal do filo. Contudo, todos os membros compartilham um conjunto de genes envolvidos na esporulação, provavelmente herdado de um ancestral comum a todas as linhagens do filo *Firmicutes* (Galperin, 2013). Desta forma, a

habilidade de formar esporos foi perdida por algumas linhagens ao longo da evolução, sugerindo que a sobrevivência ambiental por produção de um esporo viável tem um custo elevado.

2 - Bactérias aeróbias formadoras de endósporo

O termo bactérias aeróbias formadoras de endósporo (deste ponto, referidas como Bafes) é utilizado para designar espécies aeróbias que possuem a capacidade de, após uma intrincada sequência de eventos de diferenciação celular, produzir células metabolicamente dormentes e altamente resistentes, que podem germinar dentro de segundos quando as condições externas se tornam favoráveis (Niall e Halket, 2011).

Dentro do filo *Firmicutes*, as Bafes estão alocadas, principalmente, na classe *Bacilli*. Dentro dessa classe, a ordem *Bacillales* é constituída por nove famílias, das quais, sete incluem gêneros de Bafes: *Bacillaceae*, *Alycibacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae* e *Thermoactinomycetaceae* (Logan e Halket, 2011).

O esporo bacteriano representa um mecanismo de conservação de informação genética altamente eficiente (Cano *et al.*, 1995; Vreeland *et al.*, 2000; Driks, 2002; Le Duc *et al.*, 2004) e o tipo celular mais resistente conhecido. Esporos podem ser encontrados em amostras isoladas de, praticamente, todas as partes da superfície e subsuperfície terrestre (Priest, 1993; Nicholson *et al.*, 2000) associados, ainda, a animais e plantas. Essas células são frequentemente isoladas de diversos ambientes, tais como, água doce e salgada, solo e ar (Pignatelli *et al.*, 2009). A diversidade fenotípica e metabólica permite que sejam, inclusive, isolados de ambientes peculiares, tais como aqueles de temperaturas elevadas, salinidades extremas, condições ácidas ou alcalinas, entre outros (Holt, 1986; Setlow, 2006; Logan e de Vos, 2009).

Os esporos bacterianos são células completamente diferentes das células vegetativas: são bem delineadas e brilhosas quando observadas em microscopia de contraste de fase (MCF; Figura 1) e são altamente resistentes a estresses tipicamente letais às células vegetativas (Giorno *et al.*, 2007). Esporos são ainda capazes de resistir a extremos de temperatura, radiação, agentes químicos e tempo (Driks, 1999; Driks, 2002; Le Duc *et al.*, 2004). Essas propriedades são conferidas aos esporos graças às características de composição química e ultraestrutura.

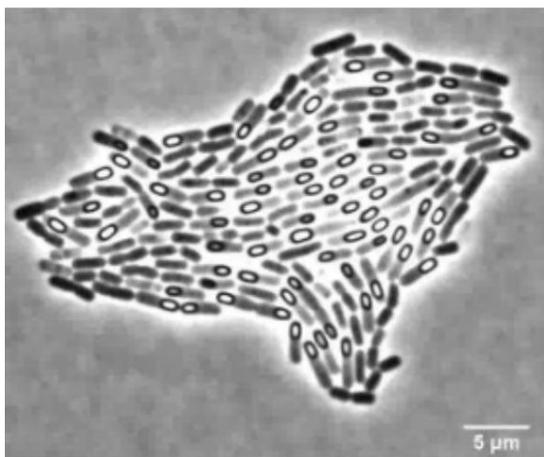


Figura 1. Microscopia de contraste de fase de células em esporulação. Células de *B. subtilis* em estágio avançado de esporulação onde é possível visualizar os esporos com o brilho característico dentro dos esporângios. Adaptado de Eijlander *et al.*, 2014.

Esporos são formados durante a fase estacionária, em resposta a uma complexa rede de transdução de sinal, que integra uma variedade de características ambientais e, pelo menos, dois fatores principais: a privação de nutrientes e densidade populacional (Driks, 1999; Miller e Bassler, 2001; McKenney *et al.*, 2013). Com o crescimento populacional há uma elevação dos níveis de proteínas secretadas, que atuam como autoindutores de *quorum sensing*. Quando as moléculas sinalizadoras atingem níveis intracelulares elevados induzem uma extensa cascata de fosforilação e, conseqüentemente, o início da formação de um esporo ou processo de esporulação.

Taxonomicamente, a capacidade de formar esporos é a característica mais importante em nível de gênero dentro do filo *Firmicutes* (Logan e de Vos, 2009; Niall e Halket, 2011). Embora o formato do esporo possa variar dentro das linhagens de uma dada espécie, a morfologia de uma célula em fase de esporulação (denominada esporângio) é característica de cada espécie e, portanto, de grande validade para classificação. A morfologia de um esporo vista por MCF é, tipicamente, entre esférica, elipsoidal ou oval, raramente apresenta-se em forma cilíndrica ou em formato semelhante ao rim ou a banana. A localização do esporo dentro do esporângio (Figura 2) também é característica notável, variando entre posições central, paracentral, subterminal e terminal (Logan e de Vos, 2009). O esporângio de algumas espécies, sendo *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* (Priest *et al.* 2002) as mais notáveis neste caso, é marcado também pela presença de inclusões cristalinas conhecidas

como δ -endotoxinas ou toxinas Cry e Cyt, frequentemente relacionadas à toxicidade em insetos e outros invertebrados (Logan e de Vos, 2009).

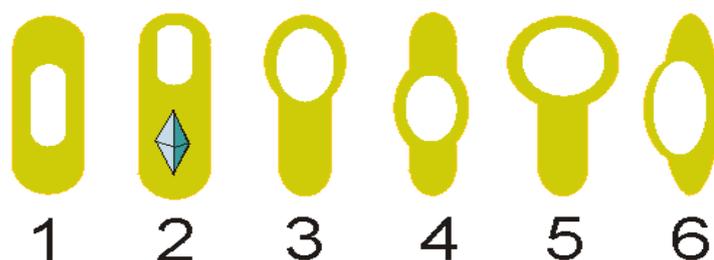


Figura 2. Modelo representativo de pré-esporos em diferentes esporângios. A localização do esporo dentro do esporângio é uma característica morfológica notável, variando entre posições central (4), paracentral (1 e 6), subterminal e terminal (2, 3 e 5). O esporângio de algumas espécies é marcado também pela presença de inclusões cristalinas (2). Adaptado de German Wikipedia, acervo livre, desenho de Kookaburra, http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bakterien_Sporen.png, acessado em 25 de Março de 2014.

O tamanho diminuto da maioria dos esporos (<1 μm), a ampla distribuição no ambiente, resistência extrema a bactericidas convencionais, além da habilidade em permanecerem dormentes e viáveis por milhares de anos, fazem com que essas células sejam singularmente bem preparadas para sobrevivência, sendo, ainda, patógenos eficientes (Davis, 1990; Cano *et al.*, 1995; Russel, 1990; Driks, 1999; Vreelan *et al.*, 2000; Driks, 2002; Le Duc *et al.*, 2004). Relatos de esporos recuperados de amostras datadas de alguns poucos séculos ou milênios são frequentes. Em 1995, Cano *et al.*, relataram esporos viáveis de *Bacillus spp.*, isolados do intestino de uma abelha fossilizada em âmbar, datados de 25-40 milhões de anos. Em 2.000 foi anunciada a descoberta de esporos viáveis de *B. sphaericus*, recuperados de cristais da salina Permian Salado, datando com 250 milhões de anos (Vreeland *et al.*, 2000). Recentemente, esta última espécie foi realocada em outro gênero, sendo designada *L. sphaericus* (Ahmed *et al.*, 2007).

2.1 - Esporo

Ferdinand Cohn foi o primeiro a descrever o processo de esporulação bacteriana e iniciou a mudança da nomenclatura de algumas espécies, como é o caso do *Vibrio subtilis*, que passou a ser designado *Bacillus subtilis*, em 1872 (*apud* Verbaendert e de Vos, 2011), e se tornou, desde então, o paradigma da esporulação. A partir daí, outras espécies, tais como o

B. anthracis, foram alocadas no gênero *Bacillus* (Fritze, 2004; Logan *et al.*, 2009; Galperin, 2013).

Em 1876, Koch observou que esporos de *B. anthracis* sobreviviam à ebulição, promovendo assim inúmeros estudos a cerca de como este tipo celular é estruturado para resistir a diversos tipos de estresses (*apud* Verbaendert e de Vos, 2011). Graças ao advento da microscopia eletrônica de transmissão (MET) observou-se que esporos são entidades complexas estruturalmente (Knaysi e Hillier, 1949), partilham uma arquitetura comum, consistindo de uma série de conchas concêntricas, funcionam como barreiras protetoras e auxiliam na compressão do material genético em um estado dessecado, cristalino e estável (Moberly *et al.*, 1966; Holt e Leadbetter, 1969).

Também é notável como essas células são capazes de construir estruturas macromoleculares complexas, na localização subcelular exata, no tempo apropriado de desenvolvimento e com precisão na montagem (Driks, 1999; Waller *et al.* 2004; Driks, 2007; McKenney *et al.*, 2010). Sabemos que a disponibilidade correta de produtos proteicos, no tempo e em quantidades apropriadas, é garantida por mecanismos altamente elaborados na regulação da expressão gênica. Entretanto, o entendimento dessa regulação por si só não explica a forma que a estrutura do esporo é de fato construída.

O estudo da morfogênese e ultraestrutura do esporo são ferramentas fundamentais para entender como Bafes constroem componentes subcelulares, direcionam e alteram a organização dos mesmos em resposta aos eventos do ciclo celular e demais estímulos ambientais (Driks, 2007).

A habilidade em guiar componentes para formar uma estrutura complexa e na posição exata requer que a informação estrutural esteja codificada nas próprias proteínas do complexo macromolecular ou em acessórios proteicos que se associem a ultraestrutura em construção (King, 1980; Driks, 1999; Hoon *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2010). Quando o estímulo ambiental externo ativa as cascatas de fosforilação, o padrão de expressão gênica da célula vegetativa é substituído pelo programa de regulação gênica especializado da esporulação, que garante uma rápida série de mudanças morfológicas. Este programa é composto por diversos fatores transcricionais, onde se destacam os fatores sigma (σ). Assim, a regulação transcricional na rede de esporulação é dominada por fatores σ associados ao núcleo da RNA polimerase (Losick e Stragier, 1992; Hoon *et al.*, 2010). A holoenzima resultante direciona a transcrição a partir de promotores ativos apenas durante a esporulação.

A formação do esporo pode ser dividida em um estágio inicial 0 e sete estágios (I à VII), morfológicamente reconhecíveis (Figura 3). Os sucessivos estágios metabólicos da

esporulação foram bem estabelecidos utilizando MCF, em conjunto com microscopia eletrônica (Piggot e Coote, 1976).

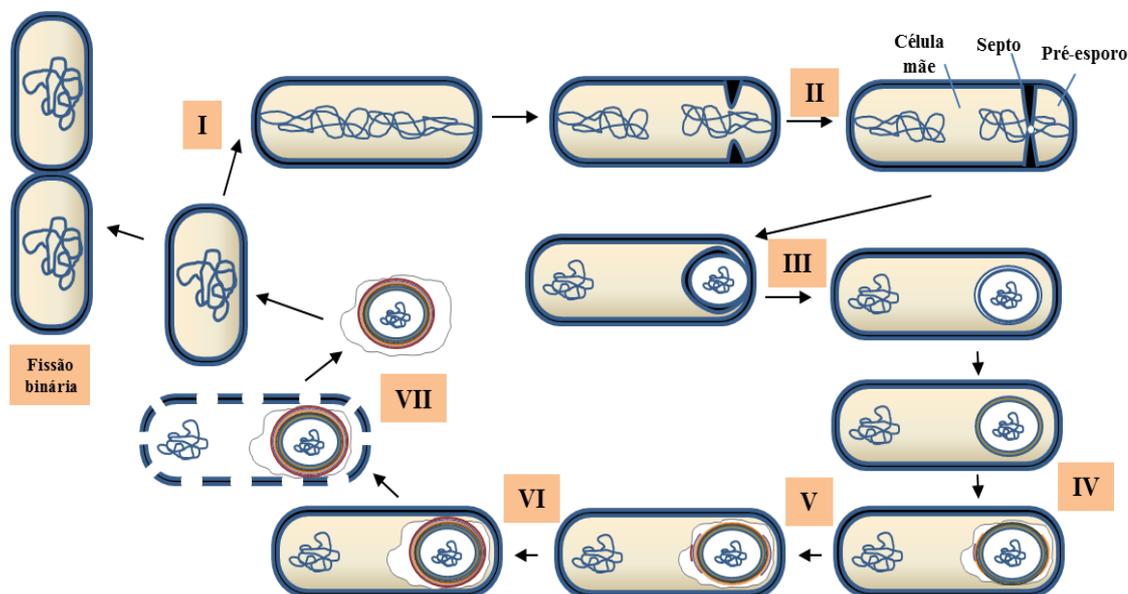


Figura 3. Ciclo celular de bactérias formadoras de endósporos. A esporulação é um processo dividido, didaticamente, em sete estágios (**I** à **VII** indicados na figura). No **estágio 0**, uma célula em final de fase logarítmica com genoma duplicado inicia o processo. A diferenciação se inicia com a formação do filamento axial (estágio **I**), seguido da formação do septo (estágio **II**) originando dois compartimentos, a célula mãe, o maior e o pré-esporo, o menor. A partir desse o momento o processo torna-se irreversível. Em seguida, a célula mãe engloba o pré-esporo (estágio **III**). Logo após o engolfamento inicia-se a formação e montagem das camadas que irão compor o esporo maduro, a deposição do córtex e possível formação do exósporo (estágio **IV**) e a estruturação da capa e outros possíveis componentes externos (estágio **V** e **VI**) como a crosta e apêndices externos ao exósporo. No estágio final (estágio **VII**), a parede celular do esporângio é lisada, liberando o esporo maduro no ambiente. Esporos são rapidamente capazes de germinar e continuar o ciclo vegetativo em resposta à presença de nutrientes.

A ultraestrutura mais comumente descrita para esses esporos (Figura 4) consiste em três subestruturas básicas: núcleo, córtex e capas (Aronson e Fitz-James, 1976; Setlow, 1995; Driks, 1999; Meador-Parton e Popham 2000; Henriques e Moran, 2007; Driks, 2007), embora outras estruturas externas possam estar presentes, por exemplo, o exósporo (Beaman *et al.*, 1972; Driks, 1999; Driks, 2002; Waller *et al.* 2004; Driks, 2007; Traag *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013) e a crosta, descrita recentemente (Waller *et al.*, 2004; McKenney *et al.*, 2010).

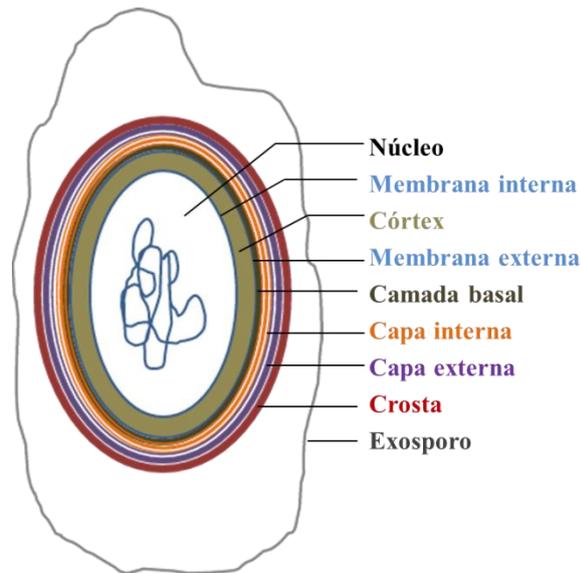


Figura 4. Ultraestrutura de esporo. Esporos bacterianos partilham uma arquitetura comum consistindo de uma série de membranas concêntricas. Apesar de apresentarem uma gigantesca diversidade no número de estruturas, espessura e complexidades de camadas, a ultraestrutura mais comumente descrita em esporos observados por MET consiste em três subunidades básicas: núcleo, córtex e capas. Outras estruturas externas frequentemente descritas em esporos são a crosta (*B. subtilis*) e o exóporo (*B. cereus*).

2.1.1 - Estágios da esporulação

Vários fatores ambientais induzem a formação de esporos: temperatura, pH, aeração, presença de certos minerais e carbono, nitrogênio e fontes de fósforo. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, dois fatores ambientais são considerados determinantes, privação nutricional e densidade populacional (Driks, 1999; Miller e Bassler, 2001; Hoon *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013). A formação do esporo representa um formidável investimento de tempo e energia, consistindo em uma intrincada sequência de eventos de diferenciação celular, sendo considerado como um recurso de sobrevivência de última instância (Hoon *et al.*, 2010). Células de *B. subtilis*, por exemplo, só se comprometem com esporulação após a falha em lidar com a privação de nutrientes de outras formas, por exemplo, o canibalismo (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003) ou estabelecimento de um estado geneticamente competente, resultante de mudanças rápidas nas expressões gênicas, que temporariamente, alteram o fenótipo (Veening *et al.*, 2006; Suel *et al.*, 2006).

A iniciação e o progresso da esporulação são controlados por uma complexa rede (Figura 5) de interações proteína-proteína e proteína-DNA, consistindo em módulos regulatórios, caminhos de sinalização, mecanismos de retroalimentação e regulação pós-

2.1.2 - Estágio 0: célula pré-divisional

Visando garantir que haja cópias suficientes na célula pré-divisional para o processo, a esporulação tem início apenas quando a duplicação do genoma está completa (Veening *et al.*, 2009). A esporulação em *B. subtilis* é iniciada pela ativação de sensores histidinaquinas (KinA, KinB, KinC, KinD e KinE) responsáveis pelo transporte de fosfato e grupamentos fosforil (PO₄), por meio de uma extensa cascata de fosforilação que resulta na ativação do regulador primário de esporulação, o fator de transcrição Spo0A (Figura 5).

Em conjunto com Spo0A ativado ou fosforilado (Spo0A-P), o fator σ^H altera a transcrição, direcionando a expressão de mais de 500 genes (Margolis *et al.*, 1991; Driks, 1999; Hoon *et al.*, 2010), em especial spoIIIGA e sigE envolvidos no processo.

2.1.3 - Estágio I: filamento axial

Durante o estágio I, os dois cromossomos são orientados com a origem de replicação ancorada a um dos pólos da célula (Teleman, 1998; Veening *et al.*, 2009; McKenney *et al.*, 2013) formando o filamento axial, que alonga a célula de forma visível por MCF (Figura 3). Portanto, o esporângio é uma célula de tamanho maior que a célula vegetativa. (Margolis *et al.*, 1991).

2.1.4 - Estágio II: formação do septo

O segundo estágio da esporulação é iniciado com uma divisão celular pela formação de um septo assimétrico (Figura 3), etapa após a qual, o processo de diferenciação torna-se irreversível (Hoon *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013). Em contraste com a fissão binária, a formação do septo é deslocada para um dos polos do esporângio e divide a célula em dois compartimentos com tamanhos e destino diferentes. O compartimento menor, o pré-esporo, irá resultar em um esporo maduro e o compartimento maior, a célula mãe, que nutre o pré-esporo até que o desenvolvimento se complete, será lisada por mecanismos de morte celular programada. Após a formação do septo, dois programas de expressão gênica distintos ocorrem em paralelo, cada um estabelecido dentro de um compartimento sob controle de fatores transcricionais e sinalização intercompartimental de controle espacial e temporal da progressão do processo (Figura 5; Hoon *et al.*, 2010). Esses dois programas permitem que a construção do esporo aconteça por fora — como resultado da síntese proteica na célula mãe — e por dentro — como consequência das proteínas sendo produzidas no pré-esporo.

Após a formação do septo apenas um terço do cromossomo do pré-esporo está localizado dentro do compartimento menor (Burton *et al.*, 2007; Ptacin *et al.*, 2008). Uma

DNA translocase, denominada SpoIIIE, localizada no centro do septo, arrasta os dois terços restantes para o compartimento do pré-esporo.

Na célula pré-divisional os fatores σ^F e σ^E estão presentes em forma inativa em ambos os compartimentos (Londono-Vallejo *et al.*, 1997; Hoon *et al.*, 2010). Após a formação do septo o σ^F é ativado, apenas no compartimento do pré-esporo, graças ao fator anti-sigma SpoIIAB, este último expresso no esporângio pré-divisional. Os 50 genes expressos sob o comando de σ^F incluem *spoIIQ*, relacionado com o processo posterior (engolfamento) e *spoIIIG*, que em conjunto com *spoIIIGA* produzido no estágio I, sinalizam a ativação do fator sigma pro- σ^E no compartimento da célula mãe (Driks, 1999; Hoon *et al.*, 2010). σ^E ativado comanda a expressão de genes cujos produtos proteicos estão envolvidos no processo de engolfamento do pré-esporo e do direcionamento do fator transcricional SpoIIID, que em conjunto com σ^E , irá ativar a segunda fase transcricional do compartimento da célula mãe e transcrição da forma inativa de σ^K (Schmidt *et al.*, 1990; Driks, 1999; Hoon *et al.*, 2010).

2.1.5 - Estágio III: engolfamento

Proteínas estruturais da célula mãe facilitam a migração de membrana em volta do pré-esporo, e a remoção enzimática de peptídeoglicano (PG) associada a esta (Figura 3; Morlot *et al.*, 2010). Assim, o engolfamento define o núcleo do pré-esporo e uma camada de membranas interna e externa, resultando no pré-esporo como um protoplasto livre no citoplasma da célula mãe.

O núcleo é o compartimento mais interno que abriga o material genético, contendo alto teor de pequenas proteínas ácido solúveis (SASPs) e dipicolinato de Ca^{2+} (DPA- Ca^{2+}) (Setlow, 1995). As SASPs são responsáveis pela acidificação do pH do citoplasma do esporo (pH 5,5-6).

A membrana interna do esporo é uma forte barreira permeável que confere resistência a diversos tipos de componentes químicos, especialmente aqueles que danificam o DNA (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2000). Essa é composta por moléculas de lipídeos imóveis durante o estado de dormência, mas que se tornam completamente móveis durante a germinação, como relatado por Cowan *et al.* (2004) em estudos de redistribuição de fluorescência.

Após o engolfamento, σ^F e produtos da expressão do régulon *rsfA* ativam a expressão de σ^G , responsável por dirigir a transcrição de mais de 100 genes, dentre esses, os que codificam a produção de SASPs (Schmidt *et al.*, 1990; Hoon *et al.*, 2010).

O núcleo é desidratado logo após a ativação de σ^G , o que torna o pré-esporo metabolicamente dormente (Stragier, 1992) e, portanto, incapaz de mobilizar macromoléculas e atuar na expressão gênica. Antes que a desidratação do núcleo ocorra, σ^G envia um sinal para o compartimento da célula mãe, mediado pela metaloprotease SpoIVFB, que é regulada por SpoIVFA e BofA, ambas as proteínas expressas tardiamente por σ^E (Driks, 1999). O sinal enviado por σ^G permite que SpoIVFB clive o fator pro- σ^K , ativando o último fator σ ativo no compartimento da célula mãe, fator σ^K (Hoon *et al.*, 2010).

O engolfamento é coordenado com a construção de duas estruturas protetoras externas do esporo: o córtex e a capa. Portanto, os estágios III, IV e V, apesar de tratados separadamente (Figura 3), ocorrem de forma simultânea.

2.1.6 - Estágio IV: formação córtex

Com σ^K em forma ativa, a síntese de grande parte das proteínas de capa é iniciada e, em conjunto com σ^G e SpoVD, ativados no estágio II, guiam a deposição do córtex (Zhang *et al.*, 1998; Driks, 1999). σ^K é responsável por dirigir a transcrição de cerca de 150 genes, incluindo a expressão de uma pequena proteína de ligação ao DNA, denominada GerE, fundamental para formação da capa (Hoon *et al.*, 2010).

O córtex (Figura 4) é composto por PG com estrutura similar ao polímero presente na PC da célula vegetativa, exceto por algumas modificações esporo-específicas, evidenciadas pela presença de ácido murâmico-delta-lactâmico e baixo nível de ligações cruzadas de peptídeos entre as camadas adjacentes de PG. O córtex é sintetizado entre as duas membranas que circulam o núcleo do esporo: interna e externa (Setlow, 1995; Meador-Parton e Popham 2000) e apresenta alta elasticidade. Essa é, portanto, uma estrutura fundamental para manter o controle de entrada e saída de água, mantendo o estado de dormência no esporo e na resistência ao aquecimento (Aronson e Fitz-James 1976; Meador-Parton e Popham 2000).

Os precursores de PG do esporo são sintetizados dentro do compartimento da célula mãe e transportados através da membrana externa do pré-esporo para o espaço intermediário entre as duas membranas, por mecanismos ainda não completamente compreendidos (McKnenney *et al.*, 2013).

2.1.7 - Estágio V: formação da capa

A forma ativa de σ^K dirige a expressão de uma série de regulóns (Figura 5), tais como, *cotA* (responsável pela produção de pigmento marrom em *B. subtilis*), *cotD*, *cotF*, *cotH*, *cotM* e *cotT*, em grande parte envolvidos com a síntese de elementos das porções interna e externa

da capa e demais camadas adjacentes (Zhang *et al.*, 1994; Driks, 1999; Henriques e Moran, 2007; McKenney *et al.*, 2013).

Em *B. subtilis*, CotA contribui para proteção contra radiação ultra violeta (UV) e peróxido de hidrogênio, pela formação de um pigmento estruturalmente similar à melanina (Hullo *et al.*, 2001).

Em conjunto com fator σ^K , a proteína GerE regula a expressão do restante dos genes envolvidos na síntese de capa ativando o grupo final de regulóns, *cotB*, *cotC*, *cotS*, *cotV*, *cotW*, *cotX*, *cotY* e *cotZ* (Zhang *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1998; Driks, 1999).

A capa (Figura 4) é um elemento crítico para as propriedades de resistência do esporo, agindo como uma barreira para enzimas degradativas e moléculas reativas, ao mesmo tempo em que permite a penetração de pequenas moléculas selecionadas e a interação com receptores de germinação localizados no interior do esporo (Driks, 1999; Young e Setlow, 2004). As propriedades da capa também contribuem para a elasticidade, acomodando mudanças no volume do esporo, que acompanham a formação e a germinação (Driks, 2004), mas representa pouca ou nenhuma importância para a resistência ao calor ou a radiação (Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2000).

A capa de *B. subtilis* tem uma aparência marcante em MET. Duas camadas da capa podem ser discernidas por MET, a camada externa e a camada interna (Figura 4). A camada interna, de aspecto lamelar fino, é composta por duas a cinco subcamadas e apresenta aproximadamente 75 nm de espessura (Driks, 1999; Driks, 2007). Circulando a camada interna, está a camada externa, frequentemente, de maior espessura (entre 70 e 200 nm). A camada externa apresenta maior contraste e tem aparência menos organizada do que a camada interna.

Pelo menos 70 proteínas diferentes são sintetizadas na célula mãe e arranjadas em torno do esporo (Figura 3), dando origem à complexa estrutura multicamada, a capa (McKenney *et al.*, 2010). Uma varredura completa de proteínas de capa de esporo em *B. subtilis*, analisadas por SDS-PAGE, demonstrou que as proteínas produzidas em maior quantidade apresenta massa molecular abaixo de 14,4 kDa e a maior diversidade de proteínas exibe massa molecular entre 21,5 e 63,3 kDa (Figura 6; Lai *et al.*, 2003). Com exceção das proteínas de alta posição hierárquica na montagem de capa — proteínas recrutadoras de outras proteínas na estrutura — individualmente, as demais proteínas de capa de esporo apresentam pouco ou nenhum efeito fenotípicamente detectável (Driks, 2002; Lai *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006). Consequentemente, as funções dessas proteínas continuam desconhecidas. É provável que as funções da capa de esporos constituam propriedades emergentes relacionadas com o grau de

organização estrutural dessas proteínas e sejam dependentes das interações específicas entre essas (McKenney *et al.*, 2013).

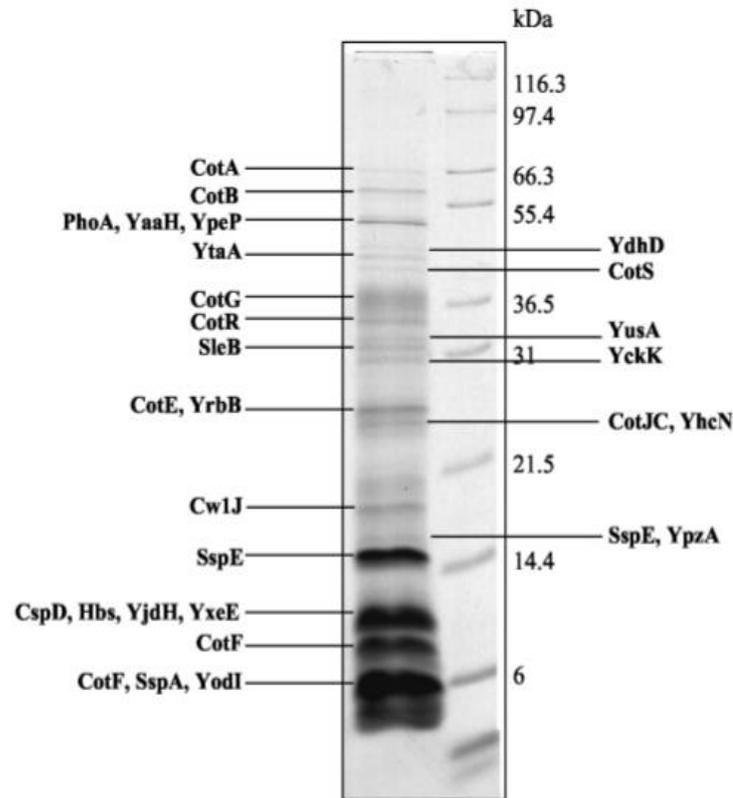


Figura 6. Proteínas de capa de esporo de *B. subtilis*. Proteínas resolvidas em SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie blue G-250. Pelo menos 70 proteínas diferentes são sintetizadas na célula mãe e arranjadas em torno da membrana externa dando origem à complexa estrutura multicamada, a capa. A maioria das proteínas exibe massa molecular entre 21,5 e 63,3 kDa. Adaptado de Lai *et al.*, 2003.

SpoIVA, SPoVM, SPoVID, SafA e CotE (e CotO dependendo da espécie, por exemplo. *B. anthracis*) são denominadas proteínas morfogenéticas e são consideradas proteínas chave ou de posição hierárquica máxima, pois têm papel relevante na morfogênese de capa (Figura 7), apesar de não interferirem na expressão gênica na célula mãe (Driks, 1999; Henriques e Moran, 2007).

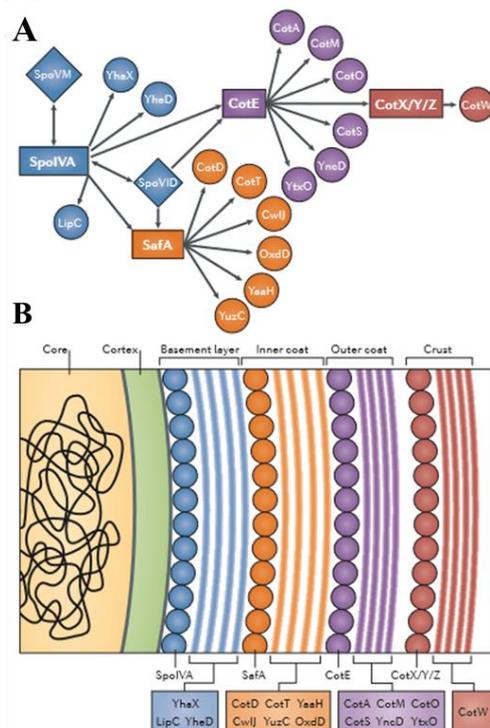


Figura 7. Rede de interações proteicas da ultraestrutura de esporo de *B. subtilis*. Quatro camadas estão representadas, a camada basal (azul), a porção interna da capa (laranja), a porção externa da capa (roxo) e a crosta (vermelho). **(A)** As proteínas morfogenéticas, ou proteínas de alta hierarquia, estão inseridas dentro de um retângulo. **(B)** A polimerização de uma proteína morfogenética cria o sítio de ligação para cada proteína individual subsequente. A rede de interações de montagem de esporo é constituída módulos interdependentes. Adaptado de McKenney *et al.*, 2013.

SPoVM e SPoVID são responsáveis pelo agrupamento de proteínas e, conseqüente, formação do invólucro do esporo (Beall *et al.*, 1993; Ramamurthi, 2009; McKenney *et al.*, 2013). A rede de interações de montagem de esporo é constituída de três módulos, mediada por proteínas de alta hierarquia interdependentes: i) a rede dependente de SafA, necessária para a montagem da capa interna; ii) a rede dependente de CotE, fundamental para a montagem da capa externa e influente sobre uma série de proteínas em ambas camadas basal e capa interna e iii) a rede dependente de SpoIVA, necessária para montagem da camada basal, ancoragem e direcionamento da montagem de capa (Takamatsu *et al.*, 1999; Ozin *et al.*, 2000; Driks, 2002; McKenney *et al.*, 2013).

O número, a espessura e complexidade das camadas da capa diferem significativamente entre espécies de *Bacillus* (Giorno, 2007). O *B. cereus* apresenta uma estrutura fina quase única (Aronson e Pandey, 1978; Waller *et al.* 2004; Driks, 2007),

enquanto *L. sphaericus* apresenta uma estrutura complexa formada por várias camadas (Holt *et al.*, 1975).

Experimentos clássicos realizados durante os anos 1970 revelaram que a estrutura bioquímica básica da capa do esporo é composta, fundamentalmente, por proteínas (Figura 7), sendo essas particularmente ricas em resíduos de aminoácidos tirosina e cisteína (Murrel, 1969; Hiragi, 1972; Aronson e Pandey, 1978). Apenas uma pequena quantidade dessas proteínas está associada a carboidratos e lipídeos. As variações entre componentes proteicos e açúcares nas camadas mais externas de esporos podem ser críticas para definir nichos ecológicos e propriedades químicas de superfície (McKenney *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010)

Tratando-se de uma série de estruturas concêntricas em formato esférico, seria intuitivo imaginar que a capa é construída em etapas, camada a camada, e de dentro para fora. Entretanto, McKenney *et al.* (2010) relataram, em *B. subtilis*, a presença de pelo menos duas proteínas de expressão tardia (CotD e CotT) na camada interna, três de expressão precoce (CotE, CotO, CotM) na camada externa e duas na camada externa, a crosta (CotW e CotZ). Esses dados sugerem que a montagem da capa se inicia de forma assimétrica, com relação a superfície do pré-esporo, e em um suporte constituído de várias camadas próximo à célula mãe (Figura 3).

2.1.8 - Estágio VI: maturação do esporo

Muitas espécies possuem estruturas adicionais que cercam a capa ou se estendem a partir dessa (Figura 4). Uma dessas estruturas é o exósporo, tipicamente descrito por MET como uma fina camada glicoproteica que circula o esporo e é separada do mesmo por uma lacuna denominada inter espaço (Sousa *et al.*, 1978; Chen *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013). O exósporo pode ainda ser facilmente removido do esporo por aplicação de agentes desnaturantes como ureia, mercaptoetanol ou hidróxido de sódio (Todd *et al.*, 2003; Redmond *et al.*, 2004; Setlow, 2006). A composição proteica do exósporo ainda não é completamente elucidada, a proteína mais caracterizada é a glicoproteína BclA, com estrutura similar ao colágeno (Thompson *et al.*, 2012; McKenney *et al.*, 2013).

Encontrada em diversas espécies (Figura 8, A e B), especialmente do grupo do *B. cereus*, essa estrutura é inexistente ou aparentemente em tamanho muito reduzido em outras espécies, tais como o principal modelo de espécies formadoras de esporos — *B. subtilis* — *B. clausii* e *B. safensis*, sugerindo que o exósporo não é uma estrutura essencial para um esporo (Beaman *et al.*, 1972; Driks, 1999; Driks, 2002; Waller *et al.* 2004; Driks, 2007; Traag *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013).

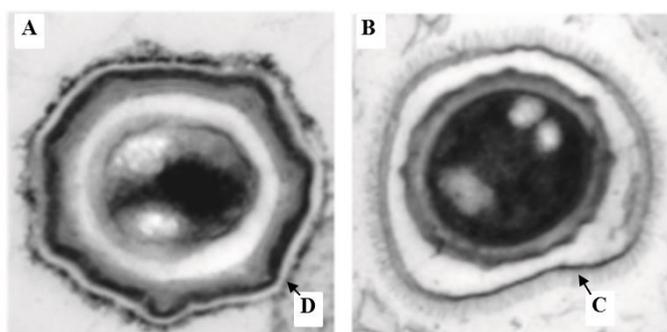


Figura 8. Estruturas externas de esporos. O exósporo é uma estrutura encontrada em diversas espécies, especialmente do grupo do *B. cereus* e inexistente, ou em tamanho muito reduzido, em outras, tais como o *B. subtilis*. **(A)** MET de espora de *B. subtilis* contrastado com vermelho de rutênio. **(B)** MET de espora de *B. anthracis* contrastado com tetróxido de ósmio. **(C)** O exósporo de *B. anthracis* é composto por uma camada basal paracristalina coberta por um espaço de estruturas, visualmente, semelhantes a fímbrias. **(D)** A crosta é uma estrutura morfológicamente similar à capa externa, porém de aparência mais consistente e grosseira. Adaptado de McKenney *et al.*, 2013.

Em adição ao exósporo, outros acessórios podem ser encontrados em alguns esporos, tais como, filamentos, estruturas semelhantes a fímbrias (Figura 8, C; Mizuki *et al.*, 1998; Driks, 1999), uma camada basal paracristalina cobrindo o exósporo de *B. anthracis* (Driks, 2002; Thompson *et al.*, 2012) ou outros componentes menores.

A incorporação de vermelho de rutênio no preparo da amostra a ser analisada por MET revelou, também, uma camada externa à capa, indetectável em MET com contrastação convencional (Waller *et al.*, 2004). Posteriormente, essa camada morfológicamente similar à capa externa, porém de aparência mais consistente e grosseira foi denominada crosta (Figura 8, D; McKenney *et al.*, 2010).

Nas diversas espécies, a superfície do espora difere mais obviamente pela presença ou ausência de exósporo, embora haja considerável diversidade de proteínas individuais de capa. Para todas as bactérias, as propriedades de superfície celular definem o alcance de interações que essas bactérias vão estabelecer com outros organismos e as diferentes superfícies. A diversidade topológica e de composição sugerem que as propriedades de estruturas externas de esporos devem contribuir para a ampla dispersão de Bafes pelos vários tipos de ambientes (Giorno *et al.*, 2007). Neste contexto, a superfície à qual o espora necessita de aderência é uma importante fonte de variação.

Considerando que a superfície do esporo representa a interface entre esse e o ambiente, a diversidade da composição de capa e de exósporo pode desempenhar papel fundamental na definição de nichos ecológicos de Bafes (McKenney *et al.*, 2013).

2.1.9 - Estágio VII: lise celular

Ao final do processo de formação do esporo, o esporângio se prepara para permitir a liberação do esporo maduro para o meio externo (Figura 3), viabilizada pela expressão de autolisinas que hidrolisam as múltiplas camadas de PG do esporângio (Driks, 1999; Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006; McKenzie *et al.*, 2013).

2.2 - Germinação

A Germinação é uma resposta ao retorno de condições ambientais favoráveis. Essa ocorre quando um germinante, ou substrato germinacional, se liga a receptores proteicos, localizados na membrana interna do esporo (Salas *et al.*, 1985; Losick *et al.*, 1986; Setlow, 2003). Em ambientes naturais agentes germinantes são geralmente pequenas moléculas tais como aminoácidos, açúcares, nucleosídeos de purina e uma mistura de asparagina, glicose, frutose e K^+ (AGFK) (Paidhungat e Setlow, 2002). Em adição, esporos podem iniciar a germinação por outros agentes, como lisoenzimas, sais, pressões hidrostáticas elevadas e surfactantes catiônicos, como dodecilaína (Gould, 1969; Setlow, 2003). É possível ainda que DPA- Ca^{2+} , liberado por outros esporos, possa atuar como um estimulante para a germinação (Setlow, 2003). É pela germinação que esporos causam patologias (Guidi-Rontani *et al.*, 1999).

É notável como esporos, mesmo metabolicamente dormentes, monitoram continuamente o ambiente que circundante. Em *B. subtilis*, esses mecanismos são mediados por um arranjo de receptores, codificados por operões homólogos aos de tricistosina denominados homólogos *gerA*. Estes receptores embudados na membrana interna reconhecem L-alanina e AGFK (Hudson *et al.*, 2001; Paidhungat e Setlow, 2002; Moir *et al.*, 2002; Setlow, 2003). Um germinante só atinge esses receptores passando pela capa e córtex, o que significa que essas membranas devem ser tanto protetoras quanto permeáveis (McKenney *et al.*, 2013). Receptores similares aos codificados pelos operões homólogos ao *gerA* também são encontrados nas demais espécies de *Bacillus* (Paidhungat e Setlow, 2002; Moir *et al.*, 2002).

A germinação é um processo irreversível que ocorre em segundos após o contato com o agente germinante e que é continuado mesmo após a remoção desses agentes (Setlow,

2003). Inicialmente ocorre a liberação de H^+ , outros cátions monovalentes e Zn^{2+} , especialmente, do núcleo do esporo, o que eleva o pH de 5,5 a 6,0 para o pH típico de um citoplasma de célula vegetativa, cerca de 6,5 a 7,7 (Jedrzejak e Setlow 2001; Setlow, 2003). A elevação do pH é essencial para iniciar o metabolismo do esporo uma vez que o posterior retorno a um estado hidratado permite atividade enzimática.

Logo em seguida ocorre a liberação de $DPA-Ca^{2+}$ e a substituição desse volume por água, sem, no entanto, permitir a mobilidade de macromoléculas (Cowan *et al.*, 2003), possivelmente como medida de proteção ou defesa, já que o processo de hidratação leva a drástica redução da termorresistência. Após a hidratação adequada do núcleo, ocorre a hidrólise da capa e do córtex e, subsequente, a expansão da PG, que servirá como *primer* de montagem para as camadas de PG da célula em crescimento (Driks, 1999; Setlow, 2003). Somente após a formação da PC a motilidade de macromoléculas retorna, permitindo a síntese de outros compostos e a conversão de um esporo em célula capaz de se dividir por fissão binária (Cowan *et al.*, 2003; Setlow, 2003). É importante ressaltar que esse processo ocorre sem que haja qualquer produção de energia detectável (Paidhungat e Setlow, 2002).

2.3 - Mecanismos de resistência de esporos

Tendo em vista a variedade de estresses que os esporos resistem, não é surpreendente que esses apresentem múltiplos mecanismos de proteção (Cowan, 2003; Setlow, 2006; Niall e Halket, 2011). A composição do esporo e a estrutura resultante desempenham um papel central na resistência. Existe inclusive um grande interesse em determinar o potencial de viabilidade de esporos ao viajar interplanetariamente (Fajardo-Cavazos *et al.* 2008).

A formação de um esporo significa gerar uma célula que pode se manter viável por extensos períodos de tempo, sem a utilização de nutrientes. Entretanto, um esporo pode retornar à atividade assim que encontra condições favoráveis. Como esporos podem precisar se manter por extensos períodos de tempo sem nutrientes, esses devem ser metabolicamente dormentes (Niall e Halket, 2011), ou seja, conter pouco ou nenhum composto de alta energia, tais como, ATP ou NADH, não exibir metabolismo de compostos endógenos ou exógenos e exibir pouca ou nenhuma atividade enzimática (Cowan, 2003; Setlow, 2006). Como não há atividade enzimática, o esporo dormente é incapaz de reparar danos em macromoléculas, como em DNA ou proteínas. Embora haja mecanismos de reparo durante o processo de germinação, se altos níveis de danos forem acumulados durante o estado de dormência, esse excesso poderá superar a capacidade de reparo (Setlow, 2003).

Consequentemente, ao longo da evolução esporos adquiriram uma grande variedade de mecanismos para proteger macromoléculas de danos acumulados em longos períodos, aparentemente, conservados entre as diversas linhagens esporulantes de *Firmicutes* (Setlow, 2006).

É importante considerar, também, que determinados tipos de estresse podem desativar certos componentes do aparato de germinação do esporo, sem inviabilizar estas células. Neste caso, mesmo com a estrutura lesionada a germinação pode ser induzida por mecanismos artificiais (Setlow *et al.*, 2002, Nicholson *et al.* 2005).

O núcleo do esporo, análogo ao protoplasto da célula vegetativa, contém a maior parte das enzimas do esporo, bem como DNA, ribossomos e tRNAs, semelhantes àqueles encontrados na célula vegetativa, exceto pela presença de algumas macromoléculas. (Gerhardt e Marquis, 1989; Cowan *et al.* 2003). A água compõe apenas 27-55% do peso do núcleo do esporo, sendo que a quantidade de água livre é extremamente limitada para restringir o movimento macromolecular. Por outro lado, durante a germinação é importante que o esporo absorva água rapidamente, para reativar a motilidade macromolecular e atividade enzimática (Cowan *et al.* 2003). O fator determinante para resistência ao calor úmido em esporos é o conteúdo de água do núcleo (Gerhardt e Marquis, 1989; Melly *et al.*, 2002; Setlow, 2003; Setlow, 2006). Quanto menor o conteúdo de água livre maior será a faixa de resistência. Em adição, o baixo conteúdo de água no núcleo do esporo é determinante para inibir a atividade enzimática.

A segunda molécula mais importante para a resistência do esporo é o DPA-Ca²⁺ (Figura 9) que compreende 5-15% do peso seco do esporo em espécies de *Bacillus*. O grande acúmulo de DPA-Ca²⁺ no núcleo do esporo é o maior responsável pela redução do conteúdo de água durante a esporulação, reduzindo assim a mobilidade de macromoléculas e conferindo resistência à temperaturas elevadas.

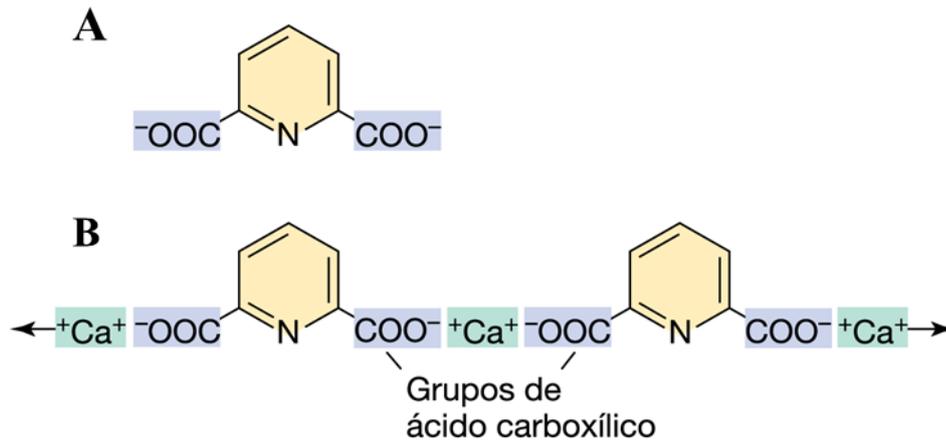


Figura 9. Ácido dipicolínico. (A) Estrutura do DPA. (B) Maneira pela qual o Ca^{2+} se associa a moléculas de DPA, formando o polímero dipicolinato de cálcio. Adaptado de Madigan *et al.* 12 ed. 2010.

Geralmente esporos em suspensões aquosas apresentam resistência à temperatura de 40 °C acima da faixa regular observada para células vegetativas (Gerhardt e Marquis, 1989; Nicholson *et al.* 2000). A morte de esporos por calor úmido, geralmente, não se dá por danos ao DNA e sim por desnaturação de enzimas nucleares e rupturas na membrana interna (Setlow *et al.*, 2002).

O conteúdo de água no núcleo do esporo pode variar, consideravelmente, dependendo das condições de cultivo. Por exemplo, esporos formados em condições envolvendo temperaturas elevadas, geralmente, apresentam menor conteúdo de água no núcleo quando comparados com aqueles formados em temperaturas mais brandas (Setlow, 2006). Conseqüentemente, os primeiros são mais resistentes. Esporos com menores quantidades de DPA- Ca^{2+} nuclear tendem a apresentar alto conteúdo de água livre, o que torna essas células mais sensíveis a temperaturas elevadas (Nicholson *et al.* 2000). A capacidade de sintetizar e armazenar DPA- Ca^{2+} sob mesmas condições de crescimento são características que variam entre as espécies (Paidhungat, 2000; Setlow, 2003; Setlow, 2006).

Embora o conteúdo de água no núcleo seja um fator decisivo, a termoestabilidade intrínseca de proteínas e a presença de íons podem colaborar para a resistência ao calor úmido. Todavia, até o momento não está claro de que forma a natureza dos íons conferem resistência. Esporos com altos níveis de Ca^{2+} tendem a apresentar maior resistência, seguidos de esporos com níveis elevados de Mg^{2+} e Mn^{2+} (Bender e Marquis, 1985; Setlow, 2006). Os que apresentam altos níveis de K^+ ou Na^+ são os de menor resistência.

O terceiro tipo de molécula relevante para a resistência do esporo são as SASPs, sintetizadas ao final do desenvolvimento do pré-esporo (Driks, 2002). As SASPs compreendem a 3-6% do total de proteínas do esporo (Setlow, 2006) e são produtos de uma família multigênica expressos em paralelo e que aparentam ser conservadas entre várias espécies, incluindo linhagens de *Clostridium*, que são anaeróbias. Entretanto, estas proteínas não apresentam homólogos em espécies não formadoras de esporos (Setlow, 2006). Conforme mencionado anteriormente, as SASPs se localizam exclusivamente no núcleo do esporo, onde se ligam à estrutura do DNA conferindo resistência a compostos químicos e especialmente a radiação UV. Como esperado, as SASPs são degradadas rapidamente durante a germinação e, caso isso não ocorra, o bloqueio na transcrição é significativo impedindo o retorno à fase vegetativa (Sanchez-Salas *et al.*, 1992; Hayes e Setlow, 2001).

Um fator adicional que pode estar envolvido com resistência à UV é a proteção de componentes do esporo (por exemplo, o DNA) por pigmentos localizados nas camadas mais externas da estrutura e que absorvam esta radiação (Nicholson *et al.*, 2005). Embora tenha sido sugerido que o baixo conteúdo de água no núcleo do esporo reduza a habilidade de radiações ionizantes γ produzirem radicais hidroxila, potencialmente perigosos para o material genético (Setlow, 2005), a característica que mais contribui para resistência de esporos expostos a radiação de 254 nm — considerada a mais eficiente para inviabilizar esporos (Nicholson *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2005) — é a composição fotoquímica do DNA contido nessa célula. Quando submetidos a radiações com comprimento de onda em torno de 254 nm, ao invés de produzir dimerização de resíduos adjacentes de timina típicos de células vegetativas — os dímeros de ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 (64PPs) — esporos produzem o dímero timidil-timidina denominado fotoproduto de esporo (do inglês, SP; Douki *et al.* 2005). Em esporos, SPs ocasionam lesões muito menos letais do que CPDs e 64PPs, uma vez que estas podem ser reparadas nos primeiros momentos da germinação por pelo menos três mecanismos: i) recombinação, ii) excisão e iii) uma enzima denominada liase SP, que monomeriza SP em dois resíduos de timidina (Rebeil e Nicholson, 2001; Cheek e Broderick, 2002; Setlow, 2006).

Existem ainda outros fatores determinantes para a resistência de esporos a radiações UV, por exemplo, a saturação do DNA com α/β SASPs, que promovem a formação de SPs e suprime CPD e 64PP (Frenkiel-Krispin *et al.* 2004). Outro fator é o alto nível de DPA- Ca^{2+} nuclear, que atua como fotossintetizante e, conseqüentemente, reduz a fotoreatividade do DNA (Douki, 2005; Setlow 2006). Tais fatores podem ser alterados em comprimentos de

onda maiores que 254 nm, entretanto, é necessária uma investigação mais minuciosa para comprovar este dado (Setlow, 2006).

Apesar de os mecanismos de resistência à radiação e a agentes químicos não serem profundamente conhecidos, sugere-se que a saturação do cromossomo, protegida pela ação de SASPs, em conjunto com a prevenção ao acesso de enzimas líticas de PG pela capa, previna a ação do peróxido de hidrogênio e radiação UV (Riesenman e Nicholson 2000)

2.4 - O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus*, composto exclusivamente por células Gram positivas, com baixo %G+C (Driks, 2003; Logan e de Vos, 2009) é o primeiro gênero pertencente à família dos *Bacillaceae*, e é notável por acomodar as espécies formadoras de endósporos de maior interesse médico, ambiental e industrial (Nicholson *et al.*, 2000; Driks, 2004; Santana *et al.*, 2008; Ohba *et al.*, 2009).

Uma grande diversidade morfológica de colônias é encontrada em *Bacillus*, tanto intra quanto inter espécies, sendo esta uma característica dependente de condições de incubação e composição de meio de crescimento (Logan e de Vos, 2009). Apesar da variedade de morfologias de colônia, algumas espécies apresentam características marcantes que as tornam morfolologicamente distinguíveis. Tipicamente, colônias de espécies de *Bacillus* mesófilos atingem entre 1-5 mm com 24-48 h de incubação, apresentam coloração amarelo claro, de diferentes tons de bege ou acinzentada (Logan e de Vos, 2009).

O *B. cereus* e o *B. thuringiensis* partilham muitas características de colônias. Ambas as espécies formam colônias que medem em torno de 2 a 7 mm de diâmetro, se apresentam entre formatos circular e irregular com bordas onduladas ou fimbriadas, geralmente, apresentam textura granulosa ou colônias suaves e úmidas e altamente viscosas (Logan e de Vos, 2009). Embora as colônias de *B. cereus* e *B. anthracis* também sejam similares, as da última espécie são, geralmente, menores, não hemolíticas, apresentam pontas mais profusas e são mais firmes em comparação à consistência daquela observadas para o *B. cereus* (Logan e de Vos, 2009). Uma diferença marcante entre morfologia de colônias dentro do grupo do *B. cereus* são as colônias rizoides de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (Flugge, 1886; Nakamura, 1998).

A presença de pigmentos também é observada em colônias, sendo os mais frequentes em tons de marrom, laranja, rosa e amarelo e, muitas vezes, característicos de determinadas espécies e/ou subespécies (Logan e De Vos, 2009).

Delprato *et al.* (2001) sugeriram ainda que os halos formados no centro de colônias de *B. subtilis* poderiam ser resultado da migração de células para as regiões das bordas da colônia, elevando assim a exposição dos organismos à radiação UV e induzindo à quimiotaxia.

Apesar da diversidade fenotípica entre as linhagens de *Bacillus*, a maioria das espécies é cultivada regularmente em meios de cultura com baixa concentração de nutrientes, tal como, o ágar nutriente ou em meios ricos, como o ágar sangue ou Luria-Bertani. Entretanto, espécies isoladas particularmente de ambientes com baixas concentrações de nutrientes, ou invariáveis, crescem de forma precária ou não crescem em meios regulares, seja pela neutralidade de pH, insuficiência de salinidade e excesso ou falta de nutrientes (Logan e de Vos, 2009).

O manual de Bergeys, segunda edição (2009), relata, pelo menos, 24 espécies de *Bacillus* que não crescem normalmente em meios regulares. Por exemplo, o *B. psychotolerans* requer meios ricos em proteínas (Abd el-Rahman *et al.*, 2002); *B. sporothermodurans* necessita de suplementação de vitamina B12 (Pettersen *et al.*, 1996); *B. fumarioli* e *B. naganoensis* são ligeiramente acidofílicos e não crescem em pH 7,0 (Logan *et al.*, 2000). Entretanto, a maioria das espécies que não crescem em meios regulares são alcalífilas: *B. alcalophilus*, *B. pseudofirmus*, *B. haloalkaliphilus*, dentre outras sete (Logan e de Vos, 2009).

A maioria das espécies de *Bacillus* utiliza glicose ou fermentação de outros carboidratos como fonte de energia, sendo o padrão de produção de ácido ou assimilação de substratos de carbono de grande valor para caracterização taxonômica (Deutscher *et al.*, 2002). Todavia, algumas espécies utilizam, por exemplo, ácidos orgânicos (*B. azotoformans*), aminoácidos (*B. benzoovorans*), ácido alantóico (*B. fastidious*) ou acetato e citrato (*B. fusiformis*) (Logan e de Vos, 2009).

As células de *Bacillus* apresentam formato de bastão, geralmente isoladas, em duplas ou forma de cadeias curtas ou muito longas, como filamentos celulares de *B. cereus*, isolados de insetos, com 100 µm (Margulis *et al.*, 1998; Logan e de Vos, 2009). Tipicamente, o formato em bastão das células do gênero *Bacillus* é arredondado nos polos. Entretanto alguns membros, por exemplo, o *B. thuringiensis* são frequentemente descritos com polos retos (Logan e de Vos, 2009). Os demais pleomorfismos celulares são tipicamente relacionados ao crescimento em condições subótimas (Logan *et al.* 2000).

A largura celular varia tipicamente entre 0,4 e 1,8 µm com comprimento entre 0,4 e 6,0 µm. As células de uma dada espécie tendem a apresentar padrões de tamanhos, por exemplo, as células de *B. pumilus*, tipicamente, medem 0,6-0,7 por 2,0-3,0 µm, enquanto que as de *B. megaterium* 1,2-1,5 por 2,0-5,0 µm (Logan e de Vos, 2009).

O citoplasma de células de *Bacillus* pode se contrastar de forma uniforme ou apresentar vacúolos, estruturas globulares que não se coram e são pouco refrateis em microscopia MCF, o que é recorrente em determinadas espécies como o *B. megaterium* (Vary, 2007; Logan e de Vos, 2009).

Bactérias Gram positivas podem produzir dois tipos de cápsulas: uma composta por ácido poliglutâmico e outra por polissacarídeos. Entretanto, dentre as linhagens do gênero *Bacillus* esta característica não tem grande valor taxonômico, já que linhagens de uma mesma espécie podem ou não produzir cápsula, como é o caso das linhagens *B. subtilis* 168 e *B. subtilis* var. *natto* em relação às demais linhagens deste grupo (Foster e Popham, 2002).

A virulência em *B. anthracis* é mediada, parcialmente, pela presença de uma cápsula de ácido poli-D-glutâmico, codificada pelo plasmídeo pXO2, sendo avirulentos os organismos que não possuem tal característica (Mock e Fouet, 2001). A cápsula de *B. anthracis* é um exemplo de como esta estrutura pode ser usada como ferramenta taxonômica, já que o plasmídeo pXO2 raramente é encontrado em outros membros do grupo do *B. cereus*. Em contraste, o outro plasmídeo de virulência do *B. anthracis* — o pXO1, onde está localizada a informação para a produção da toxina tripartida — tem sido observado em outras espécies (Logan e de Vos, 2009).

A presença ou ausência de flagelo também tem sido considerada como uma variável taxonômica. Tipicamente, em linhagens de *Bacillus* a presença de motilidade ocorre por meio de flagelos peritríqueos, embora o número de espécies de *Bacillus* flagelados não seja elevado (Aizawa *et al.*, 2002; Logan e de Vos, 2009). Frequentemente, estirpes de *B. cereus* e *B. thuringiensis* apresentam motilidade, enquanto *B. anthracis* e *B. mycoides* não (Zhang *et al.*, 1995; Houry *et al.*, 2010).

3 - Bafes de solo

O gênero *Bacillus* compreende cerca de 220 espécies, dessas pelo menos 80 (aproximadamente 40%) são encontradas em solo ou ambientes associados, como sedimentos e compostos diversos (Niall e Halket, 2011).

Espécies de Bafes de solo vêm sendo investigadas desde os primeiros isolados de bactéria no século 19 e, desde então, a metodologia tradicional para determinação da composição de comunidades bacterianas nesse ecossistema tem sido baseada em cultivos *in vitro* (Mandic-Mulec e Prosser, 2011).

Abordar a diversidade de Bafes em solo é uma questão dificultada não somente pela enorme variedade de *habitats* possíveis: arenoso, argiloso, orgânico, não agrícola, dentre outros, mas também pelas micro condições ambientais tais como, temperatura, pH, disponibilidade de água, concentração salina e aeração, parâmetros determinantes que afetam endemicamente populações de microrganismos (de Vos, 2011).

Um dos fatores que favorecem a seleção de Bafes é a habilidade de sobrevivência em temperaturas que, normalmente, seriam letais para a maioria das células vegetativas (Niall e Halket, 2011). O tratamento com altas temperaturas (60-80 °C), objetivando selecionar apenas esporos, é apropriado para estudos qualitativos de diversidade, possibilitando a determinação de características fundamentais sobre os tipos celulares presentes nas amostras. A capacidade de resistir a temperaturas elevadas aparentemente é uma característica de baixo valor, se consideradas as condições normais de solo. Entretanto, pode ser um fator essencial durante, por exemplo, queimadas, que alteram a composição de um ecossistema (Smith *et al.*, 2008).

É inegável, entretanto, que alguns outros vieses podem acontecer nesse tipo de seleção, como favorecer linhagens de Bafes que produzem: i) maior número de esporos, ii) esporos em tempos menores em meio de cultivo e iii) grande número de esporos somente sobre condições de estresse (Mandic-Mulec e Prosser, 2011). Tais vieses podem fornecer dados irreais sobre a ecologia do solo, limitando o estudo em casos de abordagens onde é feita uma ligação entre o valor real de organismos ativos ou estruturas de comunidade e ecossistema dos processos de composição do solo.

Outra grande divergência entre estudos de diversidade de Bafes baseadas em cultivo de amostras gerais de solo é, conforme mencionado anteriormente, o fato de muitos organismos não crescerem em condições rotineiras de laboratório (Logan e de Vos, 2009; Mandic-Mulec e Prosser, 2011).

Entender os padrões de diversidade de Bafes em solo é de fundamental importância e interesse, considerando os padrões cosmopolitas e o elevado potencial biotecnológico desses

microrganismos. A natureza desses padrões e as respectivas funções são ainda muito difíceis de determinar. Poucos estudos de metagenômica visaram determinar quantitativamente a atividade de Bafes em solo ou em processos específicos e das relações e atividades em comunidade microbiana (Mandic-Mulec e Prosser, 2011). De alguma forma isso é um reflexo de limitações de metodologia. Abordagens baseadas em cultivo são altamente seletivas e subestimam organismos em atividade. Embora em muitos casos esta abordagem forneça informação sobre o potencial biotecnológico, não o fazem quanto à atividade real dentro do ecossistema. Estas informações motivaram, em grande parte, o desenvolvimento do presente trabalho.

4 – Potencial biotecnológico e riscos associados à Bafes

Em adição a participação ativa nos ciclos de carbono, nitrogênio, enxofre e demais transformações de nutrientes, as linhagens de Bafes apresentam alto potencial biotecnológico, incluindo as áreas médica e agrícola (Nicholson *et al.*, 2000; Driks, 2004; Santana *et al.*, 2008; Ohba *et al.*, 2009). Por exemplo, o biocontrole de pragas de plantas, notadamente insetos, por produtos à base de *B. thuringiensis*, uma espécie que produz um cristal parasporal tóxico para diversos invertebrados (Schnepf, 1998; Jensen *et al.*, 2003; Ohba, 2009; van der Auwera *et al.*, 2013). Da mesma forma, as espécies *Paenibacillus lentimorbus* e *P. popilliae* apresentaram atividade larvicida contra besouros pragas de gramíneas (de Vos *et al.*, 2009). Além de invertebrados, fungos associados a plantas também podem ser combatidos por espécies de Bafes. Algumas linhagens de *Bacillus*, tais como, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis* têm sido comercializadas para o controle de fungos oriundos de solo, tais como, espécies dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, dentre outros, que afetam plantações e mudas de árvores (Pérez-García *et al.*, 2011).

A biorremediação de solo também tem sido explorada utilizando espécies de Bafes, tais como, linhagens do gênero *Brevibacillus*, capazes de neutralizar metais tóxicos (Ruiz-Lozano e Azcón, 2011). *Geobacillus spp* isoladas de poços de petróleo são capazes de degradar hidrocarbonetos e o potencial destas linhagens para remediação de solos contaminados por óleos está sendo investigado (Banat e Marchant, 2011).

A despeito dos inúmeros benefícios relacionados às Bafes, algumas linhagens podem representar um problema industrial, como no caso do *B. cereus*, agente causador de intoxicação alimentar, constantemente encontrado em produtos alimentícios industrializados

ou *in natura* (van der Auwera *et al.*, 2007). Outra espécie considerada um problema para a saúde e biodefesa é o *B. anthracis*, agente causador do antraz e utilizado como arma biológica (Jensen *et al.*, 2003 ; Kølsto *et al.*, 2009; Mertens *et al.*, 2014).

5 - Taxonomia fenotípica

A partir do relato de Winslow *et al.* (1920), a única característica fenotípica considerada para definir o gênero *Bacillus* por 50 anos foi a morfologia celular, ou seja, a forma em bastão. Todavia, a partir do desenvolvimento de métodos mais eficientes de isolamento, da compreensão das necessidades nutricionais e do desenvolvimento e aprimoramento da sistemática de identificação e classificação foi possível nomear e classificar os microrganismos de maneira mais adequada e, conseqüentemente, alocá-los em *taxa* apropriados (Fritze, 2004; Ludwig, 2007; Niall e Halket, 2011).

A erosão de definições antigas de gênero ocorreu, especialmente, em virtude da análise de sequências de genes rRNA 16S, que permitiram o reconhecimento de relações inter gêneros, anteriormente definidas apenas como coleções pragmáticas de espécies que partilham características chave (Niall e Halket, 2011). É importante, entretanto, que ao se definir taxonomicamente uma espécie não sejam considerados apenas níveis de relação entre sequências de genes de rRNA 16S, deixando a parte considerações fenotípicas partilhadas (Guinebretiere e Sanchis, 2003; Helgason *et al.*, 2004; Auwera e Maughan, 2011).

A tendência atual em se delinear espécies, baseando somente em rRNA 16S ou interrelações DNA-DNA, com observações fenotípicas insuficientes ou limitadas à observações de apenas um isolado, é, portanto, de baixo valor aplicável (Fritze, 2004; Niall e Halket, 2011). Ainda que as espécies de referência sejam cuidadosamente escolhidas para técnicas moleculares, conclusões errôneas podem surgir. Para espécies estreitamente relacionadas, o uso do rRNA 16S é limitado. Por exemplo, dentro dos grupos do *B. cereus* e do *B. subtilis* o baixo nível de divergência entre essas moléculas limita a resolução das relações entre as espécies (Auwera e Maughan, 2011).

A composição do grupo *B. cereus sensu lato* é alvo de intenso debate taxonômico, estando presentes na literatura vários relatos apontando que as espécies que compõem o grupo não podem ser diferenciadas estritamente por divergências genômicas (Guinebretiere e Sanchis, 2003; Helgason *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Auwera e Maughan, 2011). Nesse caso, informações subjetivas de aplicação prática, como virulência, fisiologia, morfologia e doenças relacionadas devem ser consideradas. Acredita-se que as diferentes

linhagens possam ser ecotipos e patotipos originados de um ancestral comum, cujo genoma passou por uma série de rearranjos mediados por elementos móveis de DNA (transposons, sequências de inserção e bacteriófagos), em sinergia com diversos mecanismos de transferência horizontal de genes.

Como foi mencionado anteriormente, o atual conceito de espécie define *B. anthracis* como sendo portador de dois plasmídeos pX01 e pX02, que codificam uma toxina tripartida e cápsula, respectivamente (Okinaka *et al.*, 2006). Em contraste, as linhagens de *B. thuringiensis* são caracterizadas como portadoras de uma variedade de plasmídeos que codificam isoformas de δ -endotoxinas (Ohba *et al.*, 2009; Reymond *et al.* 2010). A transferência horizontal de material genético entre membros do grupo *B. cereus* tem sido demonstrada, recorrentemente, desde solo e rizosfera (Thomas *et al.* 2001; Saile e Koelher 2006) até em insetos, mamíferos e alimentos (Andrup *et al.* 2008). Os fatores de virulência dentro das espécies do grupo do *B. cereus* estão todos localizados em plasmídeos, que, quando perdidos, tornam as espécies indistinguíveis umas das outras, dada a alta sintenia (Schnept, 1998; Rasko *et al.* 2005).

Apesar do grupo do *B. cereus* ser composto por espécies consideradas mesófilas, o *B. weihenstephanensis*, que apresenta morfologia celular, utilização de substrato e metabolismo extremamente similares a características observadas em *B. cereus sensu stricto*, pode ser diferenciado pela habilidade de crescer a 4 °C, em cultura líquida sobre agitação e ausência de crescimento acima de 43 °C (Lechner *et al.*, 1998) sendo, portanto, psicrotolerante. O *B. citotoxicus* foi primeiramente isolado durante um surto de intoxicação de origem alimentar, em 1998 na França, e foi inicialmente classificado como uma linhagem de *B. cereus* (Lund *et al.*, 2000). Divergências genéticas e fenotípicas quando comparados a outras espécies do grupo *B. cereus*, como a presença de uma citotoxina K (Lund *et al.*, 2000; Brillard & Lereclus, 2004; Fagerlund *et al.*, 2004), bem como a temperatura máxima de crescimento até 50 °C, mostraram que o *B. citotoxicus* é termotolerante e, portanto, uma espécie distinta de *B. cereus sensu stricto* (Guinebretière *et al.*, 2012).

Problemas com identificação de espécies também ocorrem no grupo do *B. subtilis sensu lato*, dividido em quatro subespécies —*B. subtilis sensu stricto*, *B. spizizenii* (Nakamura *et al.*, 1999), *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens* (Wang *et al.*, 2007) e três espécies — *B. atrophaeus* (Nakamura 1989), *B. mojavensis* (Roberts *et al.*, 1994) e *B. vallismortis* (Roberts *et al.*, 1996). A classificação é baseada em pequenas distinções entre perfis de composição de ácido graxo, análise de restrição e resistência à transformação. O único fenótipo claramente distinguível recai sobre *B. atrophaeus* que, em meio de crescimento contendo tirosina, produz

uma pigmentação marrom (Nakamura, 1989). O *B. mojavensis* e *B. vallismortis* são basicamente ecovariações de *B. subtilis*, que provocam interpretações errôneas em diagnósticos bacteriológicos. Estas espécies são classificadas taxonomicamente como diferentes, embora, só possam ser identificadas por métodos moleculares de análise de hibridação DNA-DNA e pelo fato de serem encontradas em localizações geográficas específicas — o deserto Mojave e o Vale da morte, na Califórnia, EUA (Niall e Halket 2011).

Logan *et al.* (2009) propuseram padrões mínimos para descrição taxonômica de Bafes. Nesta proposta, diversas considerações sobre a importância de uma descrição minuciosa da fisiomorfologia são levadas em consideração. A caracterização fenotípica representa, portanto, um elemento mandatório para validação de propostas de novas espécies e bancos de dados.

II. Justificativa

Existe uma demanda crescente para identificação e classificação efetiva de Bafes, por razões que incluem conhecimento básico sobre a diversidade, taxonomia apropriada, saúde pública, biodefesa, exploração do potencial biotecnológico, dentre outros.

Desde os anos 1990, espécies do gênero *Bacillus* têm sido frequentemente realocadas em outros gêneros, assim como novos gêneros têm sido propostos para alocar as novas espécies descritas. Consequentemente, na literatura especializada, o nome do gênero está sempre associado ao termo “e outras espécies relacionadas”, aqui designadas coletivamente como Bafes.

Essa adequação da taxonomia vem ocorrendo, de maneira mais significativa, graças às análises de sequências de genes de rRNA 16S, que permitem reconhecer maior diversidade entre gêneros. Contudo, tendo em vista as limitações e vieses inerentes às análises de genes de rRNA 16S e hibridação DNA-DNA, bem como a indisponibilidade de bancos de dados públicos, as abordagens polifásicas favorecem a taxonomia de procariotos, uma vez que o consenso é adquirido após a correlação entre informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. A caracterização fenotípica fornece dados fundamentais para complementar o trabalho de caracterização por filogenia. Esses dados auxiliam, ainda, na criação de quadros ecológicos e evolutivos, que permitam a manutenção de divergências taxonômicas historicamente enraizadas.

O desenvolvimento de novas técnicas para detecção, isolamento e caracterização de microrganismos proporcionou um conhecimento mais aproximado da diversidade real do mundo microbiano. A falta de paralelismo entre o conhecimento atual sobre a diversidade de Bafes e novos dados filogenéticos revela um grande dilema: o conhecimento detalhado se aplica apenas a poucos modelos, fundamentalmente, *B.subtilis* ou *B.cereus* (Driks, 2007). Sem caracterização celular e molecular aprofundada de maior número de organismos não modelo, as definições de diversidade bacteriana continuará sendo simplista e limitada.

O estudo da composição de esporo representa um importante primeiro passo para entender a montagem e função das estruturas do mesmo. Tendo em vista a enorme diversidade filogenética de linhagens de Bafes, a quantidade de dados atuais é consideravelmente insuficiente para que possamos estimar variações naturais de ultraestruturas de esporos e as respectivas funções. Grande parte dos dados atuais sobre esporos são originados de análises de microscopia eletrônica (Driks, 1999 e 2007). Essas análises relatam uma série de variações na morfologia de todas as classes de estruturas externas de esporos como, por exemplo, números variados de camadas da capa (Warth *et al.*,

1963; Aronson e Fitz-James, 1976), estruturas e apêndices de exósporo (Vary, 1994; Walker *et al.*, 2007). Esses dados mostram, portanto, que a construção do esporo pode ser feita de várias maneiras e, muitas vezes, de formas completamente diferentes das encontradas em organismos modelos.

A importância em caracterizar fenotipicamente Bafes não modelo está em expandir o conhecimento fundamental sobre diversidade bacteriana e complementar o trabalho desenvolvido em modelos tradicionais. Poucos estudos fornecem um panorama geral de características fenotípicas em diferentes linhagens não modelo. A crescente necessidade de identificar novas linhagens de Bafes eleva a importância dessa demanda por bases teóricas firmes e diversificadas. Portanto, a investigação de algumas características fenotípicas das linhagens que compõem a Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo (Cbafes), que está em fase de ampliação e estruturação no Laboratório de Bafes (LaBafes), é essencial para avaliar e nortear futuros trabalhos com essas linhagens.

III. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi coletar amostras de solo do DF, isolar bactérias aeróbias formadoras de endósporos e analisar parcialmente características fenotípicas das linhagens obtidas.

1 - Objetivos específicos

- Coletar amostras de solo do DF;
- Isolar Bafes, selecionadas por choque térmico;
- Caracterizar morfológicamente colônias, por inspeção visual;
- Caracterizar morfológicamente células vegetativas e esporos, por MCF;
- Caracterizar a composição de parede celular, por resposta a coloração diferencial de Gram;
- Purificar biomoléculas de culturas esporuladas, em gradiente de sacarose;
- Analisar a natureza química de peptídeos purificados em gradiente de sacarose, por MALDI-TOF, fluorescência e SDS-PAGE;
- Caracterizar a ultraestrutura de esporos, por MET;
- Caracterizar perfil de proteínas de capa de esporos, por SDS-PAGE;
- Caracterizar a termorresistência de esporos, por calor úmido.

IV - Material e métodos

1 - Coleta de amostras de solo

Com o auxílio de uma espátula estéril, foram transferidos cerca de 50 g da superfície do solo (entre 5 e 8 cm de profundidade) para tubos plásticos de 50 mL, com tampa de rosca, estéril. Foi coletado um total de 30 amostras de solo. Os tubos foram fechados, vedados com *Parafilm* e estocados em geladeira até o momento da utilização. Os diferentes locais de coleta de amostras foram selecionados aleatoriamente dentro do território do DF. O posicionamento geográfico da coleta foi obtido com o auxílio de um receptor de sinais do tipo GPS (Garmin GPS III).

2 - Meios de cultura

2.1 - Caldo nutriente. Peptona 0,5% (p/v); extrato de carne 0,3% (p/v); MnSO_4 0,010 g.

2.2 - HCT. Triptona 0,5%; hidrolisado de caseína 0,2% acrescidos de 50 mL de solução I (KH_2PO_4 0,5 M); 10 mL de solução II ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mM); 10 mL de solução III ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 7 mM; H_2SO_4 0,1 M) e 10 mL de solução IV ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M) para volume final de 1 L. O pH 7,25 foi ajustado com KOH e o meio foi autoclavado a 115 °C, por 30 min. No momento da utilização foi adicionada glicose 0,3%.

2.3 - Luria-Bertani. Extrato de levedura 0,5% (p/v); peptona de caseína 1% (p/v); NaCl 1% (p/v); pH 7,2.

2.4 - Meios sólidos. Os meios sólidos foram obtidos acrescentando-se ágar na concentração final de 1,8%.

3 - Isolamento e estoque de esporos

Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis. Foi realizado um pré-tratamento: 5 g de solo foram acondicionados em papel de alumínio e incubados em estufa a 80 °C por 5 h (Santana et al., 2008). A amostra foi processada como descrito pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, 1985), com modificações: 1 g de solo pré-tratado foi transferido para tubos de 15 mL contendo 10 mL de NaCl 0,8%, agitado em vórtice por 60 s e deixado em repouso à temperatura ambiente, por 2 min. Um mL de sobrenadante foi submetido a um choque térmico de 80 °C por 10 min e incubado em gelo por 5 min. Cem μL foram inoculados em ágar nutriente, pH 7,2. Após 24-72 h de incubação a 28 °C, células de colônias com morfologias de interesse foram inspecionadas por MCF,

quanto à presença de esporos. As linhagens esporulantes foram avaliadas quanto à morfologia, posição do esporo no interior do esporângio e presença ou não de deformação do mesmo. As amostras foram induzidas à esporulação a 28 °C, com agitação de 200 rpm, em meio caldo nutriente, ou HCT, pH 7,2. Quando pelo menos 90% da população estava esporulada, uma alíquota de 1 mL foi submetida a um choque térmico de 80 °C por 10 min, incubada em gelo por 5 min e 300 µL da suspensão de esporos transferidos para 5 tubos de preservação de microrganismos contendo tiras de papel de filtro. Esse material foi seco em estufa a 37 °C, os tubos foram vedados com *Parafilm* e estocados à temperatura ambiente para futuras análises.

4 - Linhagens e crescimento

As linhagens de Bafes cultivadas, em CN sólido como descrito anteriormente, foram submetidas a análises morfológicas de colônias (visual) e células (MCF). Uma colônia isolada das linhagens obtidas foi inoculada em 200 mL de meio CN ou HCT líquido e crescida como descrito acima. O ciclo celular foi acompanhado por MCF. A tabela I apresenta as linhagens SDF (0030-0154) isoladas e caracterizadas neste estudo.

5 - Propriedade tintorial

Para determinação da composição da parede celular (PC) foi utilizada a coloração de Gram. A composição da PC das linhagens que resultaram em Gram variável foi confirmada misturando KOH 0,3% a uma pequena quantidade de células.

6 - Ensaios de atividade hemolítica. A presença de atividade hemolítica foi avaliada pela transferência de células de uma colônia isolada para ágar sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado com pérolas de vidro e base para ágar sangue, Acumedia) contido em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, divididas em 8 quadrantes. A presença de degradação de hemácias (região transparente em torno das estrias de células) observadas em dois experimentos independentes foi considerada como atividade hemolítica positiva. O *B. thuringiensis israelensis* foi utilizado como controle positivo.

7 - Purificação de biomoléculas

Para extração dos componentes celulares presentes nas linhagens de interesse foi utilizada ultracentrifugação em gradiente de sacarose (Bfxkten e Roberts, 1960, com alterações). Duzentos mL de cultura esporulada como descrito acima foram centrifugados a 6.000 x g (Centrifuga Hettich 420 R rotor R/6565), a 10 °C, por 40 min. O sedimento foi ressuspenso em 60 mL de NaCl 0,3 M (Serva), EDTA 0,01M, pH 8,0 (J.Baker) e centrifugado a 22.000 x g (Ultracentrifuga Hitachi Himac, rotor 49) por 20 min. O sedimento foi ressuspenso em 30

mL de água contendo PMSF 1,0 mM e centrifugado nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de tampão TTN (20 mM de Tris; 0,3 M de NaCl; 0,1% de Triton X-100 pH 7,2; Sigma) e armazenado a -20 °C até o carregamento do gradiente de sacarose. Para o gradiente foram, gentilmente, transferidos 6 mL de solução de sacarose (Sigma) com concentrações 84%; 79%; 72%; 67% e 54% para tubos de ultracentrífuga (Beckman 25/89 mm), que permaneceram em repouso por 24 h, à temperatura ambiente. As amostras foram sonicadas 3x com pulsos e intervalos de 1 min em 15 W (Qsônica Q55), transferidas para um recipiente contendo gelo, carregadas no topo do gradiente e centrifugadas a 95.000 x g (Beckman Coulter optima I-90k, rotor SW28), por 1h a 4 °C. Após a centrifugação e com o auxílio de seringas de 10 mL contendo agulha com calibre 18G, foram coletadas 6 bandas por tubo e armazenadas a -20 °C até o tratamento posterior. Ao material contido em cada banda foram adicionadas a 30 mL de solução Triton X-100 (Sigma) a 0,1% e as amostras centrifugadas a 95.000 x g por 45min. O sedimento foi ressuspensionado em tampão PBS (150 mM NaCl; 10 mM NaHPO₄; 0.005% NaN₂; pH 7.4) com inibidor de protease e armazenado a -20 °C para serem analisadas posteriormente.

8 - Seleção de bandas de gradiente de sacarose

As bandas do gradiente de sacarose foram analisadas por MCF e selecionadas quanto ao seu conteúdo. As bandas contendo número elevado de esporos não foram analisadas neste trabalho. As bandas selecionadas foram denominadas com o número da linhagem seguido por algarismo romano em sequência do topo para o fundo do tubo (I a VI). Para remoção de sacarose associada ao material biológico contido nas bandas obtidas pelo gradiente foram utilizadas membranas de filtração UFC910024 Amicon com PLHK ultrace-100 regenerated cellulose (Millipore).

9 - Fluorescência

Alíquotas do material biológico contido nas bandas selecionadas foram diluídas em concentrações apropriadas variando entre 1.000; 8.000 e 16.000 vezes e analisadas no espectrofluorímetro Jasco FD-6500. Espectros de excitação e emissão de fluorescência das amostras foram obtidos e analisados utilizando os programas SpectraManager e SpectraAnalysis, respectivamente. Todos os gráficos de absorção foram obtidos em comprimento de onda entre 220 e 750 nm. Os picos máximos de absorção foram considerados para obtenção dos espectros de emissão.

10 - Perfil eletroforético de proteínas

Cerca de 20 µL de cada amostra extraída de gradiente de sacarose foram carregados em gel de poli(acrilamida) 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE; Amersham ECL). Os géis foram corados por azul de Coomassie R250. As imagens dos géis foram digitalizadas e analisadas.

11 – Espectrometria de massa MALDI-TOF

As massas moleculares exatas dos componentes foram determinadas utilizando o espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics) mediante calibração externa sob modo de operação refletido e positivo nas faixas de m/z de 400-6000 Da. O volume de 1 µL de cada amostra foi depositado em placa (96 MSP, Bruker Daltonics) e secados em temperatura ambiente. O material seco foi então coberto com 1 µL de matriz composta de ácido α -ciano-4-hidroxibenzoico (CHCA). As razões m/z monoisotópicas de componentes moleculares monocarregados ($[M+H]^+$) foram listadas e organizadas.

12 - Ultraestrutura de esporos e cristais

Ao final da esporulação, as culturas contendo esporos livres foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g (Centrifuga Hettich 420R; rotor R/6565), a 4 °C, por 20 min. O material foi lavado por duas vezes com água Mille-Q, fixado por 4 h com solução de Karnovsky (Paraformaldeído 1%; Glutaraldeído 3% em Tampão Cacodilato 0,07 M), o excesso de fixador foi removido por sucção e lavado quatro vezes em solução tampão Cacodilato 0,07 M para a remoção total do fixador. Após a fixação foi adicionado à amostra uma solução pós-fixadora de ferrocianeto de potássio 10% (Synth) e tetróxido de ósmio (VWR OsO₄ 1% em tampão cacodilato 0,07 M; pH 7,2) na proporção de 1:1 e mantido no escuro, à 28 °C, por 1 h. O excesso da solução pós-fixadora foi removido e a amostra lavada duas vezes com água destilada, misturada ao contrastador de acetato de uranila 0,5% (Acetato de uranila 0,5 g; sacarose 9,9 g em 100 mL água) e armazenada a temperatura ambiente, por 12 h. O excesso de contrastador foi removido e a amostra lavada três vezes com água destilada. As amostras foram desidratadas com gradientes de acetona (concentrações: 30%; 50% 70%: 90%; 100%), à temperatura ambiente, por 15 min para cada concentração. Após a desidratação as amostras foram infiltradas com resina Spurr (Araldite) e acetona (Vetec), nas respectivas proporções de 1:2; 1:1; 2:1, e finalmente apenas a resina, cada fase durando 6 h. As amostras incluídas em resina pura foram armazenadas em estufa 60 °C, por 48h para polimerização e cortadas em micrótomo (LEICA EM UC6) para análise em MET. Para aprimorar a visualização de estruturas externas, uma duplicata das amostras foi submetida à

contrastação com vermelho de rutênio. Como primeiro fixador foi utilizado 1 mg de vermelho de rutênio (Sigma) e 69% (0,1 M) de cacodilato de sódio em 31% de glutaraldeído 8%, a 37 °C por 1 h, seguido de lavagem com PBS. As amostras foram então fixadas novamente em 1 mg de vermelho de rutênio e 0,05 M de cacodilato de sódio em 50% de tetróxido de ósmio (4%), à temperatura ambiente por 3 h, seguido de lavagem em PBS. As amostras contrastadas foram desidratadas com gradiente de etanol (concentrações: 30%; 50% 70%: 90%; 100%), à temperatura ambiente, por 15 min para cada concentração. Após a desidratação as amostras foram infiltradas em resina Spurr (Araldite) e acetona (Vetec), nas respectivas proporções de 1:2; 1:1; 2:1 e, finalmente, apenas a resina, cada fase durando 6 h. As amostras incluídas em resina pura foram armazenadas em estufa 60 °C, por 48h para polimerização e cortadas em micrótomo para análise em MET. As imagens obtidas foram comparadas àquelas contrastadas com uranila para investigação da presença de estruturas externas não observadas na ausência de rutênio.

13 - Purificação e análise de proteínas de capa de esporo

Esporos das linhagens SDF selecionadas, obtidos como descrito, foram lavados duas vezes com água Mille-Q e o sedimento centrifugado. Para extração dos componentes solúveis de capa de esporo, os sedimentos foram submetidos a condições desnaturantes (tampão Laemlli contendo DDT), seguido de rompimento mecânico (vórtice), por 30 s e fervura, por 10 min. O processo de rompimento foi repetido três vezes. Após breve centrifugação o sobrenadante foi carregado em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE; Amershan ECL) e corado por azul de Coomassie R250. As imagens dos géis foram digitalizadas e analisadas.

14 - Análise de termorresistência de esporos

Cem mL de cultura das linhagens SDF em final de esporulação, obtidos como descrito acima, foram submetidos à temperatura de 130 °C, durante 30 min ao calor úmido (autoclave vertical; Phoenix modelo Luferco AV30). Como controle positivo foi utilizado Attest 1262 B.I/Steam contendo esporos de *G. stearothermophilus* (3M). As amostras foram então inoculadas em meio de LB sólido e incubadas a 28 °C por período de até 48 h. As colônias obtidas foram analisadas por MCF e características morfológicas comparadas contra as informações contidas no banco de dados da CBafes, para excluir a possibilidade de contaminação. Todos os testes foram realizados em duplicata.

V - Resultados e discussão

1 - Coleta e isolamento de linhagens SDF

A importância de estudos básicos sobre a diversidade e potencialidades biotecnológicas de Bafes levou ao isolamento, identificação e preservação de linhagens de solo do DF com diferentes características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas.

As amostras de solo foram coletadas em áreas escolhidas, aleatoriamente, dentro do DF. Os pontos de coleta foram georreferenciados com auxílio de um GPS (Garmin GPS III). Imediatamente após a coleta as amostras foram estocadas a 4 °C.

É importante destacar que, a abordagem utilizada para a coleta não implica no estabelecimento de nenhum compromisso de cunho ecológico. Nosso objetivo foi isolar o máximo possível de linhagens distintas de Bafes resultantes do conjunto de características de seleção utilizado e, não necessariamente, montar redes de correlações entre comunidades e ecossistemas desse tipo de substrato. Em razão da metodologia de isolamento, também, fica implícito que a alteração de outras características nas condições de seleção, como a ampliação da faixa de tratamento térmico das amostras de solo para 60-80 °C, teria resultado em maior número e diversidade de linhagens. Entretanto, este trabalho ficou limitado às espécies resistentes a temperatura máxima utilizada em protocolos para isolamento de esporos, ou seja, 80 °C.

As amostras foram processadas como descrito pela OMS (*Anonimous*, 1985), com modificações. Para aumentar a eficiência do número de isolados foi realizado um pré-tratamento de 5 g das amostras de solo acondicionados em papel de alumínio estéril e incubados em estufa a 80 °C, por 5 h, como proposto por Santana *et al.* 2008. Esses autores observaram um incremento significativo no número de unidades formadoras de colônias por grama de solo pré-tratado, quando comparado ao número de isolados obtidos de solos não tratados, o que foi confirmado durante este isolamento.

Após o pré-tratamento, 1 g de solo foi transferido para um tubo de vidro contendo 10 mL de NaCl 0,9 M e agitado com vigor. Cem microlitros da suspensão resultante foram inoculados em meio LB sólido. O crescimento de colônias foi acompanhado, visualmente, após a incubação das placas de Petri em estufa a 28 °C.

O tempo de crescimento de colônias foi extremamente variado, tendo sido observado períodos na faixa de 24 h a três semanas para que as colônias pudessem ser visualizadas (dados não mostrados). Diversas morfologias coloniais foram observadas e, por critérios de exclusão, aquelas que apresentaram características de Bafes foram pré-selecionadas. As

linhagens de colônias candidatas foram, então, utilizadas para a confirmação da seleção de Bafes, por MCF.

Este material biológico foi avaliado por métodos microbiológicos clássicos (Fritze, 2004; de Vos *et al.*, 2009; Logan *et. al*, 2009), que incluem caracterização fenotípica das células vegetativas, em esporulação e esporo livre no meio por MCF, como descrito posteriormente.

As 125 linhagens obtidas e caracterizadas (Tabela I) durante a realização deste trabalho foram designadas com as iniciais SDF (Solo do Distrito Federal) seguido de um numeral 0030-0154, que indica a ordem de isolamento. Estas linhagens estão estocadas à temperatura ambiente, em forma de esporos. Em conjunto com 29 outras linhagens, isoladas anteriormente por nosso grupo, e originárias de solo de outra região do DF (SDF001-0029), constituem o acervo de linhagens ambientais da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes).

Tabela I. Linhagens SDFs isoladas e caracterizadas durante este trabalho

Linhagem SDF	Esporo		Presença de Cristal	Gram	Hemólise (°C)		Motilidade*
	Morfologia	Posição no esporângio			28	37	
0030	oval	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0031	oval	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0032	oval	terminal	sim	variável	positiva	negativa	NO
0033	oval	terminal a central	não	positivo	negativa	negativa	+
0034	oval	terminal	não	positivo	positiva	positiva	+
0035	redondo	terminal	não	variável	negativa	negativa	NO
0036	oval	terminal e subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0037	oval	terminal	não	variável	positiva	positiva	+
0038	redondo	terminal	não	positivo	negativa	negativa	NO
0039	oval	terminal	não	variável	negativa	negativa	NO
0040	redondo	terminal a subterminal	não	variável	negativa	negativa	NO
0041	oval a redondo	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0042	oval	terminal a central	sim	variável	positiva	negativa	+
0043	redondo	terminal a central	sim	variável	negativa	negativa	+
0044	oval	terminal	não	variável	positiva	positiva	NO
0045	oval	terminal a subterminal	sim	variável	positiva	positiva	NO
0046	oval	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0047	oval	subterminal a central	sim	variável	negativa	negativa	+
0048	oval	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0049	oval	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0050	redondo	subterminal	sim	variável	negativa	negativa	+
0051	redondo	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0052	oval	terminal	não	variável	negativa	negativa	NO
0053	oval	terminal	sim	variável	positiva	positiva	NO
0054	oval	subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0055	redondo	subterminal a central	sim	variável	negativa	negativa	NO
0056	redondo	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0057	redondo	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0058	oval	terminal a central	sim	variável	negativa	negativa	NO
0059	oval	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0060	oval	terminal	não	variável	negativa	negativa	NO
0061	oval	subterminal a central	sim	positivo	positiva	positiva	NO
0062	redondo	terminal	sim	variável	positiva	positiva	+
0063	oval	terminal a central	sim	positivo	positiva	positiva	NO

Tabela I. Linhagens SDFs isoladas e caracterizadas durante este trabalho (Cont.)

Linhagem SDF	Esporo		Presença de Cristal	Gram	Hemólise (°C)		Motilidade*
	Morfologia	Posição no esporângio			28	37	
0064	oval	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0065	oval	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0066	oval	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	+
0067	redondo	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0068	oval	terminal a central	sim	variável	negativa	negativa	+
0069	redondo	terminal	não	variável	negativa	negativa	+
0070	oval a redondos	terminal a subterminal	não	variável	positiva	positiva	NO
0071	oval	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0072	redondo	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0073	oval a redondos	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0074	oval	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0075	oval	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0076	oval a redondo	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0077	oval	terminal a subterminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0078	redondo	terminal a central	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0079	oval	subterminal a central	sim	variável	negativa	negativa	NO
0080	redondo	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0081	oval	terminal a subterminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0082	oval	terminal a subterminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0083	oval	terminal a central	sim	positivo	positiva	positiva	NO
0084	oval	terminal a central	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0085	oval	terminal	sim	variável	negativa	negativa	NO
0086	oval	terminal a central	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0087	redondo	terminal a subterminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0088	oval a redondo	terminal a subterminal	sim	positivo	negativa	positiva	NO
0089	oval	terminal	sim	positivo	positiva	positiva	NO
0090	oval	central a subterminal	sim	variável	positiva	positiva	+
0091	oval	terminal	sim	positivo	positiva	positiva	NO
0092	oval	subterminal a central	sim	variável	negativa	negativa	NO
0093	oval a redondo	terminal a central	sim	variável	negativa	negativa	+
0094	oval	central	sim	variável	negativa	negativa	NO
0095	oval	terminal a subterminal	sim	positivo	positiva	negativa	NO
0096	oval a redondo	terminal	sim	variável	positiva	negativa	NO
0097	oval	terminal a subterminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO
0098	oval	terminal	sim	positivo	negativa	negativa	NO

Tabela I. Linhagens SDFs isoladas e caracterizadas durante este trabalho (Cont.)

Linhagem SDF	Esporo		Presença de Cristal	Gram	Hemólise (°C)		Motilidade*
	Morfologia	Posição no esporângio			28	37	
0100	oval	terminal	sim	positivo	positiva	positiva	+
0101	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0102	oval	central a terminal	sim	variável	positiva	positiva	+
0103	oval a redondo	central a subterminal	sim	variável	positiva	positiva	NO
0104	oval a redondo	terminal a subterminal	sim	variável	positiva	positiva	+
0105	oval	central a subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0106	oval	central a subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0107	oval	central	nao	positivo	positiva	negativa	NO
0108	oval	ND	não	ND	positiva	positiva	NO
0109	oval	ND	não	variável	negativa	negativa	NO
0110	oval a redondo	subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0111	redondo	terminal	não	positiva	negativa	negativa	NO
0112	oval	central a subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0113	oval a redondo	subterminal a central	não	variável	positiva	positiva	+
0114	oval a redondo	central	não	variável	positiva	positiva	+
0115	oval	subterminal a central	não	variável	positiva	positiva	+
0116	redondo	terminal	não	ND	positiva	positiva	+
0117	oval	central	não	variável	positiva	positiva	+
0118	oval a redondo	central a subterminal	não	variável	negativa	positiva	+
0119	oval	subterminal a central	não	positiva	positiva	positiva	NO
0120	oval	subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0121	oval	central	não	positivo	positiva	positiva	+
0122	oval	subterminal	não	variável	positiva	positiva	NO
0123	redondo	central	sim	variável	positiva	positiva	+
0124	oval	central	não	variável	positiva	positiva	NO
0125	oval	central a subterminal	sim	variável	positiva	positiva	+
0126	oval	central	sim	variável	positiva	positiva	+
0127	oval	central a subterminal	não	positivo	positiva	positiva	NO
0128	oval	central	não	ND	positiva	positiva	NO
0129	oval	central a subterminal	não	variável	positiva	positiva	+
0130	oval	subterminal	sim	variável	positiva	positiva	NO
0131	oval	subterminal	sim	variável	positiva	positiva	NO

Tabela I. Linhagens SDFs isoladas e caracterizadas durante este trabalho (Cont.)

Linhagem SDF	Esporo		Presença de Cristal	Gram	Hemólise (°C)		Motilidade*
	Morfologia	Posição no esporângio			28	37	
0132	oval	central	sim	positivo	positiva	positiva	+
0133	oval a redondo	ND	não	ND	positiva	positiva	NO
0134	oval	central a subterminal	não	ND	positiva	positiva	NO
0135	oval	central a subterminal	sim	positivo	positiva	positiva	+
0136	oval	terminal	não	ND	positiva	positiva	NO
0137	oval	subterminal	sim	positivo	positiva	positiva	+
0138	oval	central a terminal	não	positivo	positiva	positiva	NO
0139	oval	terminal	não	positivo	positiva	positiva	+
0140	oval	terminal	não	positivo	positiva	positiva	NO
0141	oval	subterminal a central	não	ND	positiva	positiva	NO
0142	oval	central a terminal	não	positivo	positiva	positiva	+
0143	oval	ND	não	positivo	positiva	positiva	+
0144	oval	central	sim	variável	positiva	positiva	NO
0145	oval	subterminal	sim	positivo	positiva	positiva	+
0146	oval	central a subterminal	não	positivo	positiva	positiva	+
0147	oval a redondo	central	sim	positivo	positiva	positiva	NO
0148	oval	central a subterminal	não	positivo	positiva	positiva	+
0149	oval	subterminal	não	positivo	positiva	positiva	+
0150	oval	central a subterminal	não	ND	positiva	positiva	NO
0151	oval	central a subterminal	não	positiva	positiva	positiva	NO
0152	oval	central a subterminal	não	positiva	positiva	positiva	NO
0153	oval	ND	não	ND	positiva	positiva	NO
0154	oval	ND	não	ND	positiva	positiva	NO

ND: não determinado. NO: Não observado. *A presença de motilidade foi observada apenas pela movimentação das células sob MCF. Não foram realizados testes específicos de motilidade.

A CBafes está localizada no Laboratório de Microbiologia/LaBafes da UnB/IB/Departamento de Biologia Celular, onde são desenvolvidos projetos envolvendo isolamento e caracterização de linhagens de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) de interesse científico, sendo essa área, uma das especialidades dos pesquisadores desse Laboratório. Além disso, os projetos que envolvem a CBafes tem sido desenvolvidos e motivados pelo potencial tecnológico dessas linhagens para os setores médicos, humano e animal, agropecuário, ambiental e industrial. Atualmente, a Coleção dispõe de um acervo catalogado de 190 amostras, sendo 154 linhagens selvagens (SDF0001-SDF0154) descritas acima e compreende duas subcoleções: a primeira, composta de linhagens produtoras de cristais parasporais e a segunda de não produtoras. O acervo ainda inclui uma linhagem (*Bacillus sp* FT9) isolada de uma fonte termal, com genoma completamente sequenciado e em fase de publicação. Linhagens recombinantes expressando uma proteína de fluorescência verde (GFP), sendo oito de *B. thuringiensis* e uma de *B. circulans*, todas construídas em no LaBafes, também estão incluídas. Culturas “tipo” e mutantes de *B. thuringiensis* totalmente curado de plasmídeos (Cry-; hospedeiras para expressão heteróloga) provenientes de centros de referência, dentre outras, completam a coleção atual.

Apesar dos resultados apresentados por si só serem insuficientes para uma classificação das linhagens em todos os níveis taxonômicos, é importante ressaltar que essa caracterização inicial revelou uma diversidade considerável (Tabela I).

Todas as células vegetativas apresentaram morfologia bacilar com o arranjo típico dessa morfologia — estreptobacilos — com cadeia de tamanhos diversos (resultados não apresentado). Por comparação entre as diversas linhagens, também, foi observado que o tamanho celular variou consideravelmente, como o esperado para este grupo de bactérias.

A coloração diferencial de Gram também foi incluída para confirmar as observações por MCF (Tabela I). A maioria das estirpes apresentou resultado típico, ou seja, retenção do primeiro corante (cristal violeta), resultando em coloração final roxa, típica de bactérias Gram positivas. Essa coloração é de suma importância para definir Bafes com resultados atípicos (Gram variável). A composição da PC das linhagens que apresentaram resultado Gram variável foi confirmada misturando KOH 0,3% a uma pequena quantidade de células. Tipicamente, a fina PC de Gram negativas é facilmente lizadas por essa solução de alcalina. Por esta razão, após este tratamento, a suspensão de células Gram negativas torna-se viscosa, pois o material citoplasmático, notadamente, o DNA, é liberado. Ao contrario, as bactérias

Gram positivas, com PC contendo um número elevado de camadas de PG, não são vulneráveis ao efeito dessa base.

A localização do pré-esporo, deformação ou não do esporângio foram analisadas e estão descritas na tabela II. Embora esse grupo de propriedades de um esporo não seja uma característica particular de uma dada espécie, a morfologia e caracterização de um pré-esporo, por MCF, corrobora outros tipos de caracterização, sendo de grande importância em taxonomia.

Adicionalmente, as linhagens descritas acima foram avaliadas quanto a capacidade de produzir hemólise, *in vitro*, em temperaturas de 28 e 37 °C. Dentre as 125 linhagens obtidas durante este trabalho, 58,06% (72/125) foram positivas quando incubadas a 28 °C e 57,25% (71/125) foram positivas a 37 °C, como avaliado pela presença de halo em meio ágar sangue (Tabela I). A avaliação deste fator de virulência é relevante no contexto de patogenias provocadas por estas linhagens, que conhecidamente produzem um grande arsenal de atividades citotóxicas, dentre estas diversos tipos de hemolisinas (Van der Auwera *et al.*, 2007; Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013). Outro fator relevante em analisar virulência, incluindo a atividade hemolítica, é o auxílio na tomada de decisão de estratégias ao explorar o potencial biotecnológico das mesmas.

Apesar de não terem sido realizados testes específicos para a presença de flagelos, a motilidade pode ser observada pela movimentação típica de algumas linhagens sob MCF (Tabela I). Em razão da importância taxonômica, para as linhagens onde movimento não foi observado testes apropriados para analisar a produção de flagelos, bem como o tipo, serão realizados em experimentos futuros.

Com o intuito de ampliar a caracterização preliminar das linhagens SDFs descritas para a CBafes, dezenove linhagens SDFs foram selecionadas. Os dados de posicionamento geográfico e as características básicas das linhagens SDFs mencionadas estão sumarizadas nas tabelas II e III, respectivamente. A linhagem ambiental isolada de uma fonte termal, *Bacillus sp.* FT9 (Oliveira *et al.*, 2013) faz parte do acervo da CBafes e, embora, não tenha sido isolada de solo, foi incluída nesta caracterização por ter o genoma completamente sequenciado e em fase de publicação. Portanto, esta linhagem será utilizada como referência para correlacionar dados gerados neste trabalho.

As 19 linhagens SDFs foram selecionadas por apresentarem considerável diversidade fenotípica desde as primeiras abordagens de caracterização (Tabela III). Os resultados estendidos para essa linhagens visam enfatizar essa diversidade. Adicionalmente, os

resultados obtidos foram responsáveis por direcionar a abordagem subsequente neste trabalho, abrindo, ainda, uma série de possibilidades para futuras linhas de pesquisa.

Tabela II. Origem geográfica das amostras de solo utilizadas neste trabalho

Amostra	Coordenadas	
	Latitude	Longitude
SDF01	-15.767609	-47.865069
SDF02	-15.767610	-47.865075
SDF05	-15.767610	-47.865083
SDF07	-15.767588	-47.865090
SDF08	-15.767583	-47.865081
SDF09	-15.767582	-47.865071
SDF11	-15.767643	-47.865178
SDF13	-15.767638	-47.865200
SDF15	-15.767611	-47.865186
SDF21	-15.767493	-47.865325
SDF24	-15.767482	-47.865305
SDF29	-15.767504	-47.865321
SDF30	-15.571365	-47.994757
SDF41	-15.571347	-47.994794
SDF42	-15.571371	-47.994786
SDF47	-15.571327	-47.994799
SDF48	-15.571327	-47.994795
SDF49	-15.571347	-47.994781
FT9	ND	ND

ND: não determinado.

Tabela III. Características fenotípicas de linhagens da SDF selecionada para análises completares

Linhagem SDF	Esporo			Gram	Hemólise (°C)		Motilidade*
	Morfologia	Localização	Deformação do esporângio		28	37	
0001	oval	central a subterminal	-	positivo	+	+	+
0002	oval	subterminal	-	variável	+	+	+
0005	redondo	terminal	+	variável	+	+	+
0007	oval	subterminal	-	positivo	-	-	NO
0008	oval	central	+	positivo	-	-	+
0009	oval	central	-	positivo	+	+	NO
0011	redondo	terminal	-	variável	+	+	NO
0013	oval	subterminal	-	variável	+	+	+
0015	oval	subterminal	+	variável	+	+	NO
0021	oval	subterminal	+	positivo	-	-	NO
0024	oval	subterminal	-	variável	-	-	NO
0029	redondo	terminal	-	variável	-	-	+
0030	oval	terminal	-	positivo	-	-	NO
0041	oval	terminal		positivo	-	-	NO
0042	oval	terminal a central	+	variável	-	-	+
0047	oval	subterminal a central	+	variável	-	-	+
0048	oval	terminal a subterminal	+	variável	-	-	+
0049	oval	terminal a subterminal	+	variável	-	-	NO
0051	redondo	terminal a subterminal	-	variável	-	-	NO
FT9	oval	central a subterminal	-	variável	+	+	NO

NO: Não observado. *A presença de motilidade foi observada apenas pela movimentação das células sob MCF. Não foram realizados testes específicos de motilidade.

2 - Perfil de biomoléculas de culturas de Bafes em final de esporulação

Diversas Bafes são largamente utilizadas pela indústria, como fontes produtoras de enzimas industriais, compostos bioquímicos, antibióticos e pesticidas (Harwood, C. R. 1992; Cutting, 2006; Park *et al.*, 2007). Identificar biomoléculas produzidas pelas linhagens SDF representa um primeiro passo, fundamental para verificar o potencial biotecnológico das mesmas.

Com o intuito de montar um perfil de biomoléculas e componentes celulares produzidos pelas linhagens SDF selecionadas, 200 mL de cultura em final de fase de esporulação foram centrifugados, o sedimento recuperado e tratado como descrito em material e métodos. Estas suspensões concentradas foram transferidas para tubos de ultracentrifugação em gradiente de sacarose para obtenção do material de interesse. Antes ser coletado, o material biológico resolvido por ultracentrifugação foi fotografado para documentação (Figura 10). Todas as bandas do gradiente foram recuperadas e imediatamente armazenadas a -20 °C até o momento das análises. A respectiva distribuição das bandas ao longo do gradiente foi registrada (dados não mostrados).

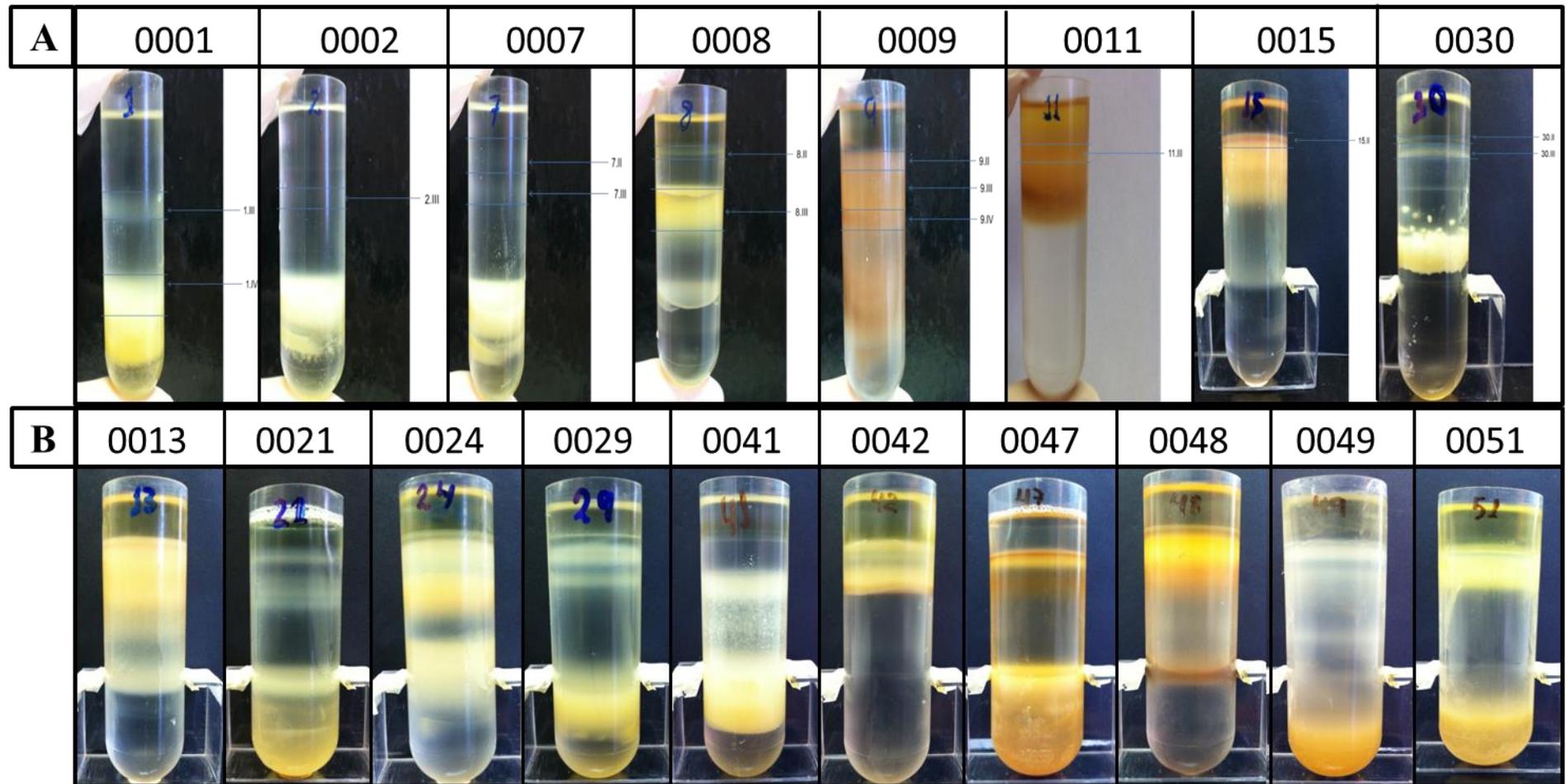


Figura 10. Perfil de biomoléculas de culturas de Bafes em final de esporulação. Duzentos mL de cultura pura de cada linhagem SDF em final de fase de esporulação foram adicionados a um gradiente de sacarose, ultracentrifugados e todas as bandas foram coletadas. As bandas foram analisadas quanto ao conteúdo, homogêneo ou heterogêneo, por MCF. **(A)** Gradientes contendo as 14 bandas — indicadas por uma seta — que foram selecionadas para análise posterior, quanto à presença de fluoróforos. **(B)** Não foram selecionadas bandas desses gradientes de sacarose para análise posterior. O perfil do gradiente corrobora a diversidade das linhagens SDFs, pois demonstra a grande variedade de quantidade e tipos compostos que podem ser isolados nessas linhagens. A análise dos gradientes permitiu ainda a visualização da produção de diversos tipos de pigmentos entre as linhagens SDFs 0009; 0011; 0015; 0047 e 0048.

Foi observada uma grande diversidade, não somente no número de bandas obtidas para as 19 linhagens SDF, como também na distribuição das mesmas ao longo do gradiente (Figura 10). É importante ressaltar que diversas porções do gradiente apresentaram alta concentração de material, sendo necessário, em estudos futuros, que essas regiões sejam melhor resolvidas, em um segundo gradiente contendo concentrações de sacarose apropriadas para estender a distribuição do material, permitindo purificação devida.

A análise dos gradientes permitiu ainda a visualização da produção de diversos tipos de pigmentos entre as linhagens SDFs (Figura 10). Um grande número de espécies bacterianas é conhecido pela produção de melaninas (Claus, 1986; Kotob, 1995), dentre eles *Actinomicetos*, *Streptomicetos*, e, principalmente, *Bacillus* e *Azobacter* (Harwood, 1989; Holt, 1996). A formação de melaninas é um processo oxidativo radical que acontece em compostos fenólicos influenciados pela ação da luz, radiação, temperatura e a presença de metais (Jacobson, 2000). Melaninas constituem uma classe geral de complexos heteropolímeros-polifenólicos, divididos tradicionalmente entre melaninas marrom escuras (eumelaninas) e vermelhas ou amarelas (feomelaninas).

Melaninas são condutores bio-orgânicos com propriedades físicas e químicas únicas. Essas propriedades conferem uma enorme variedade de funções a essas moléculas na natureza, incluindo papéis como fotoprotetores, mediadores de transporte de carga, escavadores de radicais livres, antioxidantes e desempenham um papel como um estabilizador de membrana (Prota *et al.*, 1992). Portanto, as melaninas constituem um material atrativo, com uma gama de aplicações industriais em medicina, farmacologia, cosméticos dentre outros campos, além de proverem uma nova classe de polímeros semicondutores (Jacobson, 2000). A exploração de síntese microbiana desses materiais é uma opção para desenvolvimento de produção em escala comercial.

Durante a esporulação, certas linhagens de *B. megaterium*, produzem um pigmento vermelho associado à membrana, considerado um tipo de carotenóide (Mitchell *et al.*, 1986). Carotenóides são produtos da biossíntese de isopropeno e vêm sendo relatados em diferentes grupos de bactérias. Geralmente esses pigmentos atuam como estabilizadores de membrana celulares, analogamente à função de hopanóides ou esteróis (Mitchell *et al.*, 1986).

A habilidade de carotenóides em conferir cor elevou o interesse comercial da utilização dessas moléculas, predominantemente, como corantes naturais. Em adição à utilização como corantes, carotenóides também são amplamente consumidos em dietas, em razão de propriedades nutricionais de precursores vitamínicos (Perez-Fons *et al.*, 2011).

Neste trabalho não foram realizadas análises aprofundadas sobre a composição dos pigmentos encontrados, o que pode ser explorado em projetos de linha de pesquisa distinta. Todavia, como mencionado acima, a presença de pigmentos é uma característica que demonstra não só potencial biotecnológico, como também, apresenta algum valor taxonômico, tal como, a linhagem de *B. subtilis* 168, única entre as demais do grupo do *B. subtilis* a produzir pigmentação (Foster e Popham, 2002).

As bandas obtidas em gradiente de sacarose foram analisadas por MCF quanto ao seu conteúdo (homogêneo ou heterogêneo). As bandas contendo número elevado de esporos não foram analisadas neste trabalho.

Seguindo o critério de exclusão descrito acima foram selecionadas 14 bandas com o intuito de triar e identificar grupos moleculares existentes em cada linhagem. As bandas selecionadas para análise, bem como a respectiva localização no gradiente de sacarose estão mostradas na figura 10A. As amostras que não foram analisadas durante este trabalho estão mostradas na figura 10B.

A técnica espectroscópica de fluorescência é utilizada amplamente na caracterização biofísica e estrutural de macromoléculas. O advento da detecção de moléculas individuais e novas classes de sondas moleculares possibilitaram a análise de correlações espectroscópicas de fluorescência com moléculas de interesse biotecnológico, tornando a análise de fluoróforos quase um requisito para abordagens bioquímicas e biofísicas (Lakowicz, 2007).

Dessa forma, a presença de fluoróforos nas amostras analisadas foi priorizada inicialmente, visando correlacionar essa característica com projetos futuros de caracterização estrutural de moléculas de interesse tecnológico, por exemplo, as proteínas. Em função disso foi necessário realizar uma varredura individual dos espectros de absorção de cada amostra a fim de identificar o comprimento de onda de excitação de cada molécula. Inicialmente, esperávamos reconhecer os tipos de moléculas encontradas nas bandas com a utilização de outras técnicas espectroscópicas, como o infravermelho. No entanto, após verificarmos a presença de várias proteínas, identificadas dentre os espectros de excitação e emissão (Figuras 10 a 26), selecionamos abordagens direcionadas para esse tipo de molécula, incluindo a verificação do conteúdo e grau de pureza dessas proteínas nas amostras analisadas.

Todos os espectros de absorção foram obtidos em comprimento de onda entre 220 e 750 nm e todos os picos de excitação foram correlacionados individualmente quanto à presença de fluoróforos. Os espectros de absorção relativos a cada banda de gradiente de sacarose estão apresentados nas figuras 11 a 24C. Os espectros de emissão que corresponderam aos picos de excitação para a cada banda do gradiente de sacarose estão

apresentados nas figuras 25 a 27. Embora vários espectros de absorção tenham sido obtidos, apenas os que apresentaram picos de excitação foram apresentados neste trabalho. Espectros considerados negativos para emissão foram desconsiderados.

Os espectros de emissão obtidos foram comparados com sondas moleculares conhecidas (Lakowicz, 2007). Suposições quanto a possíveis classes de fluoróforos, com base na região de comprimento de onda em que os picos de emissão se encontravam, foram realizadas. Os resultados estão representados nas figuras 25 a 27. As classes de fluoróforos encontradas foram tirosina (23,5%); triptofano (17,54%); FAD ou lipopigmentos, porfirinas, colágenos ou pirodixina (11,7% cada); triptofano ou colágeno, piridoxina ou FAD, NADH, fenilalanina ou tirosina (5,88% cada). Diferentemente dos outros componentes, banda 9.II apresentou um pico de emissão de intensidade elevada na região de comprimento de onda 540-560 nm (Figura 26), típica de sondas de lipopigmentos. Conforme mencionado, a linhagem SDF0009 produz um intenso pigmento marrom e esta emissão de fluorescência atípica pode ser resultante dessa característica.

As amostras apresentando conteúdo protéico, identificado nos espectros de emissão apresentados, foram selecionadas para investigação do grau de pureza e massa molecular dessas moléculas. Para tanto, as técnicas biofísicas como o perfil eletroforético em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e a espectrometria de massa por MALDI-TOF foram priorizados. Os espectros contendo as razões monoisotópicas de componentes moleculares monocarregados ($[M+H]^+$) e as imagens dos géis SDS-PAGE relativos a cada banda de gradiente de sacarose estão apresentados nas figuras 11 a 24B e A, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que o gradiente de sacarose, como realizado, facilitou o isolamento de proteínas desconhecidas, o que motiva a continuidade dessa pesquisa, como perspectiva, na área de purificação e caracterização físico-química e estrutural dessas proteínas selecionadas. Vale ressaltar que algumas das amostras analisadas apresentaram perfil proteico com aproximadamente 90% de grau de pureza. Essas amostras serão priorizadas nos estudos futuros, por exemplo, a cristalografia, uma vez que a purificação total será uma etapa relativamente fácil e permitirá a obtenção de proteínas para cristalização e resolução da estrutura tridimensional.

É importante ressaltar que o objetivo destas abordagens neste trabalho foi realizar uma triagem inicial de grupos moleculares e a análise do perfil proteico preliminar de algumas bandas obtidas no gradiente de sacarose e de algumas linhagens SDFs. Os resultados obtidos demonstram que as abordagens escolhidas são eficazes para este tipo de triagem, possibilitando, inclusive, a extração e purificação de proteínas. Uma caracterização

aprofundada sobre essas biomoléculas requer a utilização de técnicas e equipamentos mais apropriados, principalmente aquelas de caracterização físico-química e estrutural, representando também outra possibilidade de linha de pesquisa.

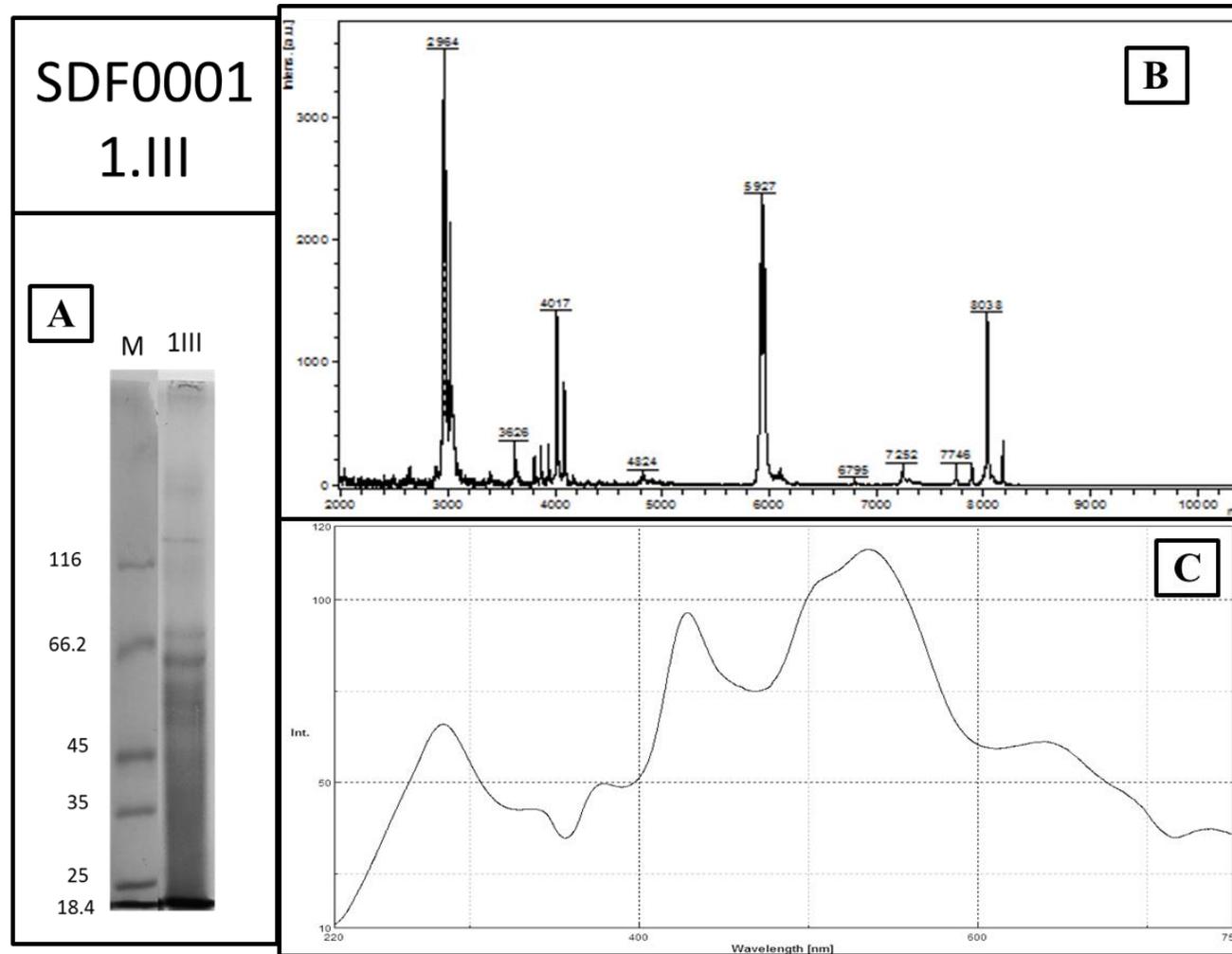


Figura 11. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

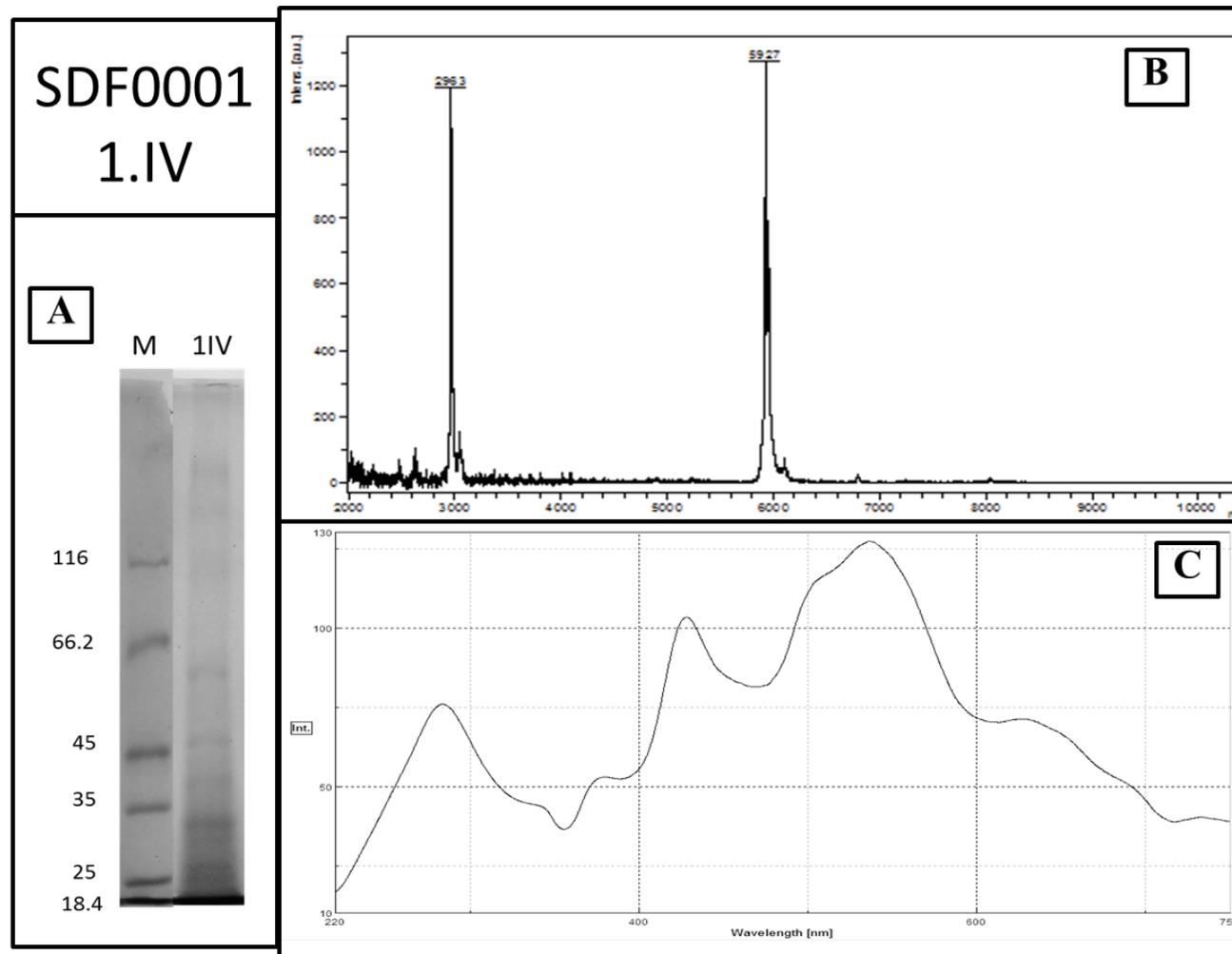


Figura 12. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão. O perfil de espectrometria de massa é sugestivo de uma proteína purificada.

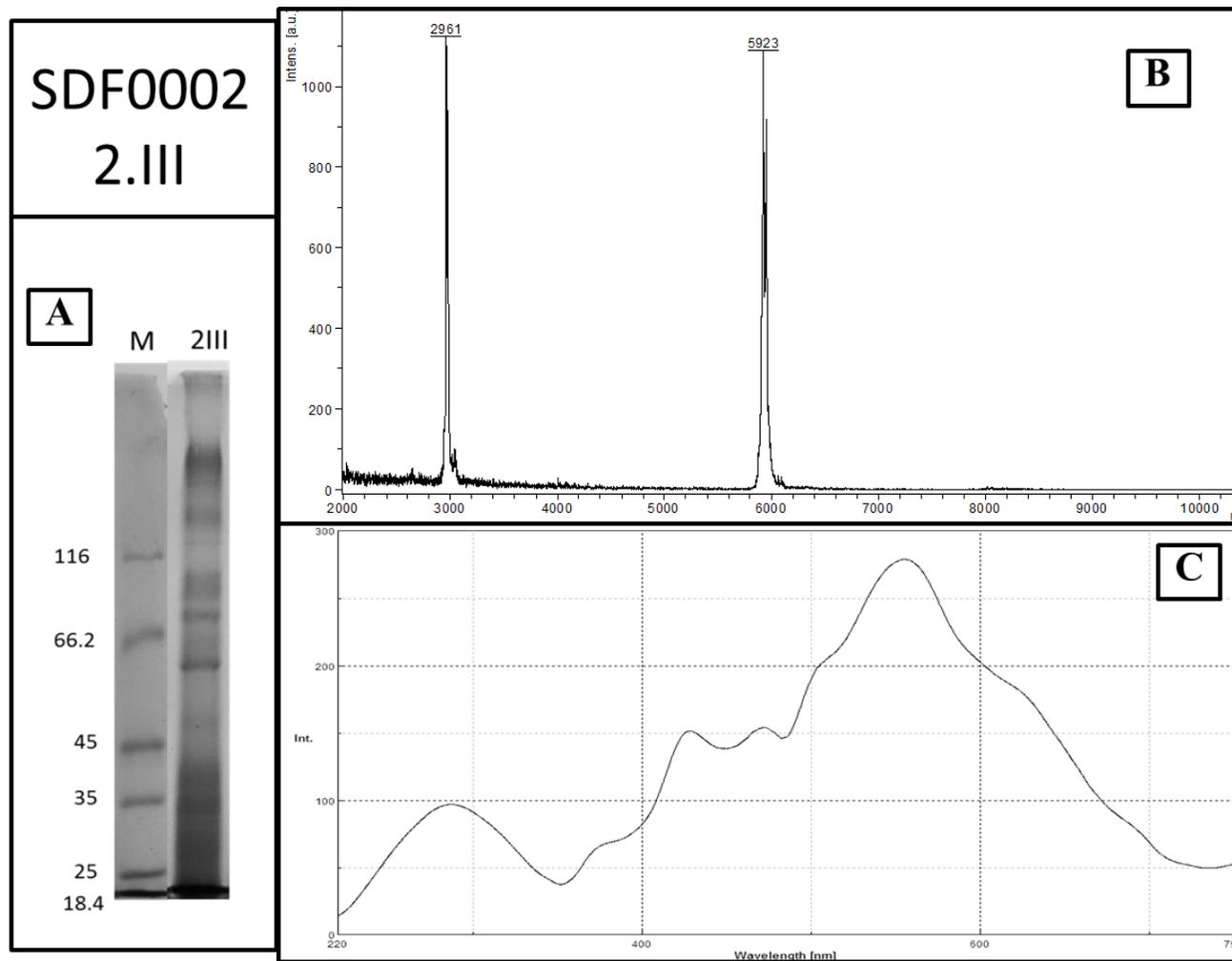


Figura 13. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão. O perfil de espectrometria de massa é sugestivo de uma proteína purificada.

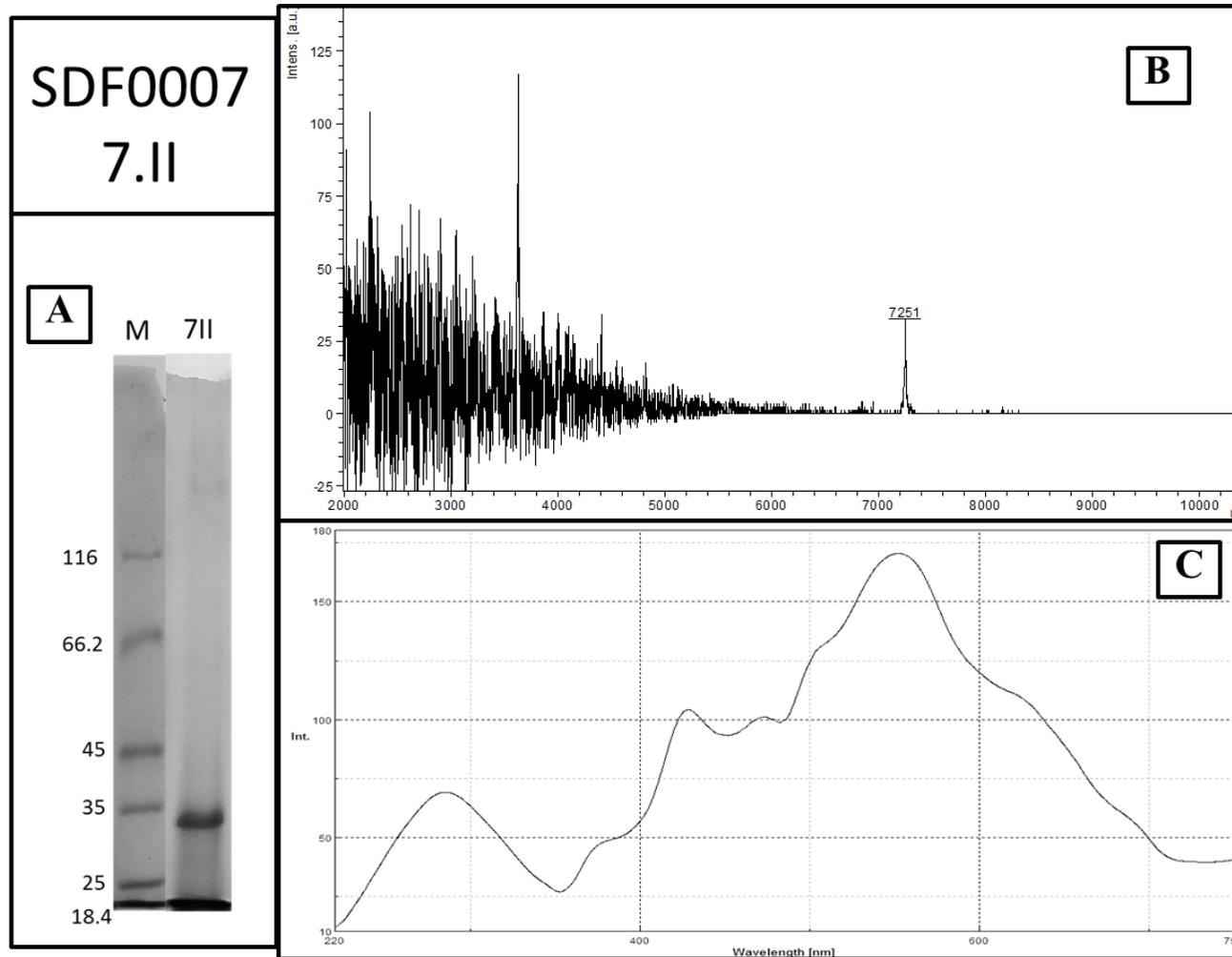


Figura 14. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão. O perfil eletroporético é sugestivo de uma proteína purificada identificável na região próxima a 35 kDa. O perfil de espectrometria de massa apresentou ruído característico da presença de contaminação, como por exemplo, sacarose não removida ou da consistência da própria amostra.

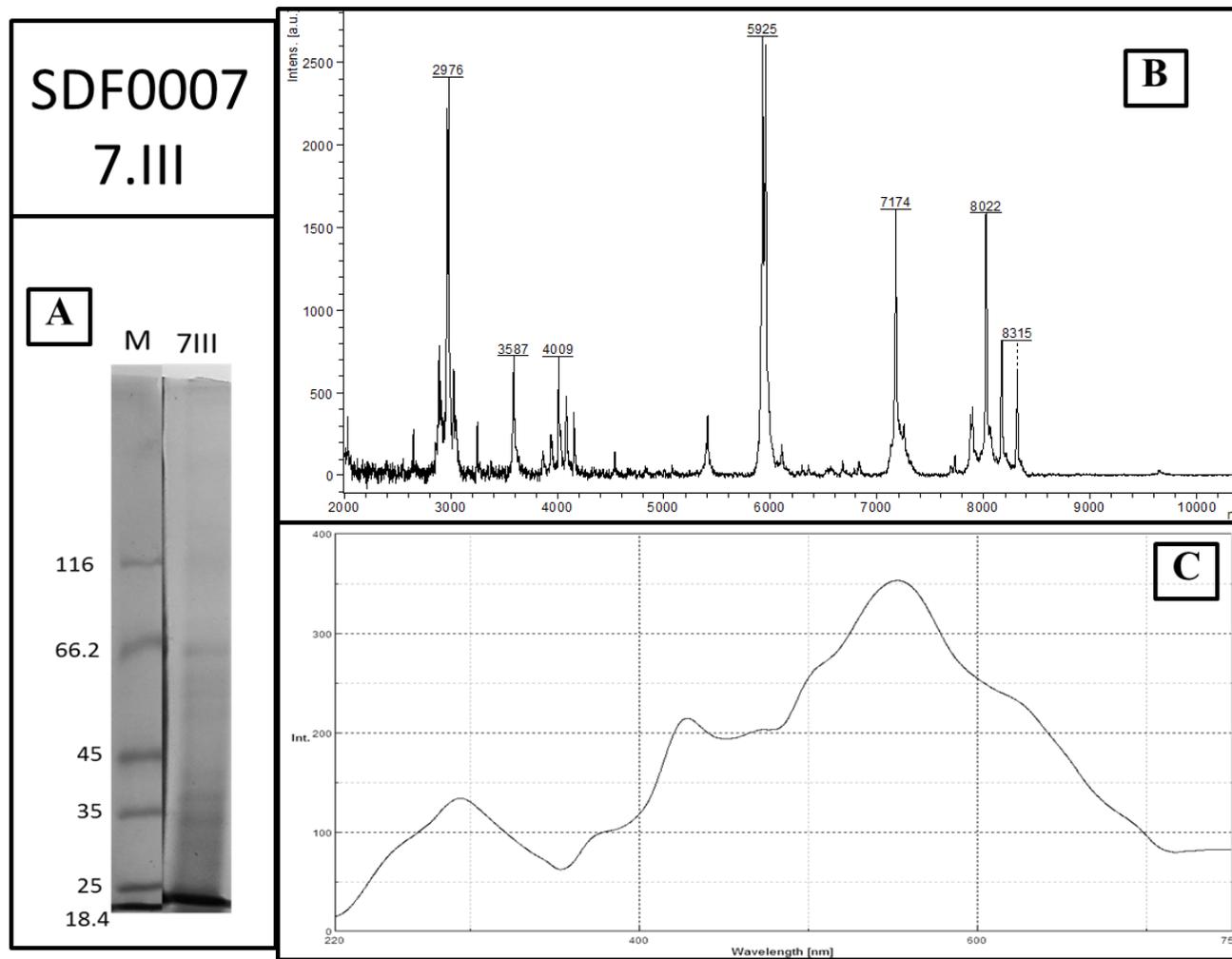


Figura 15. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

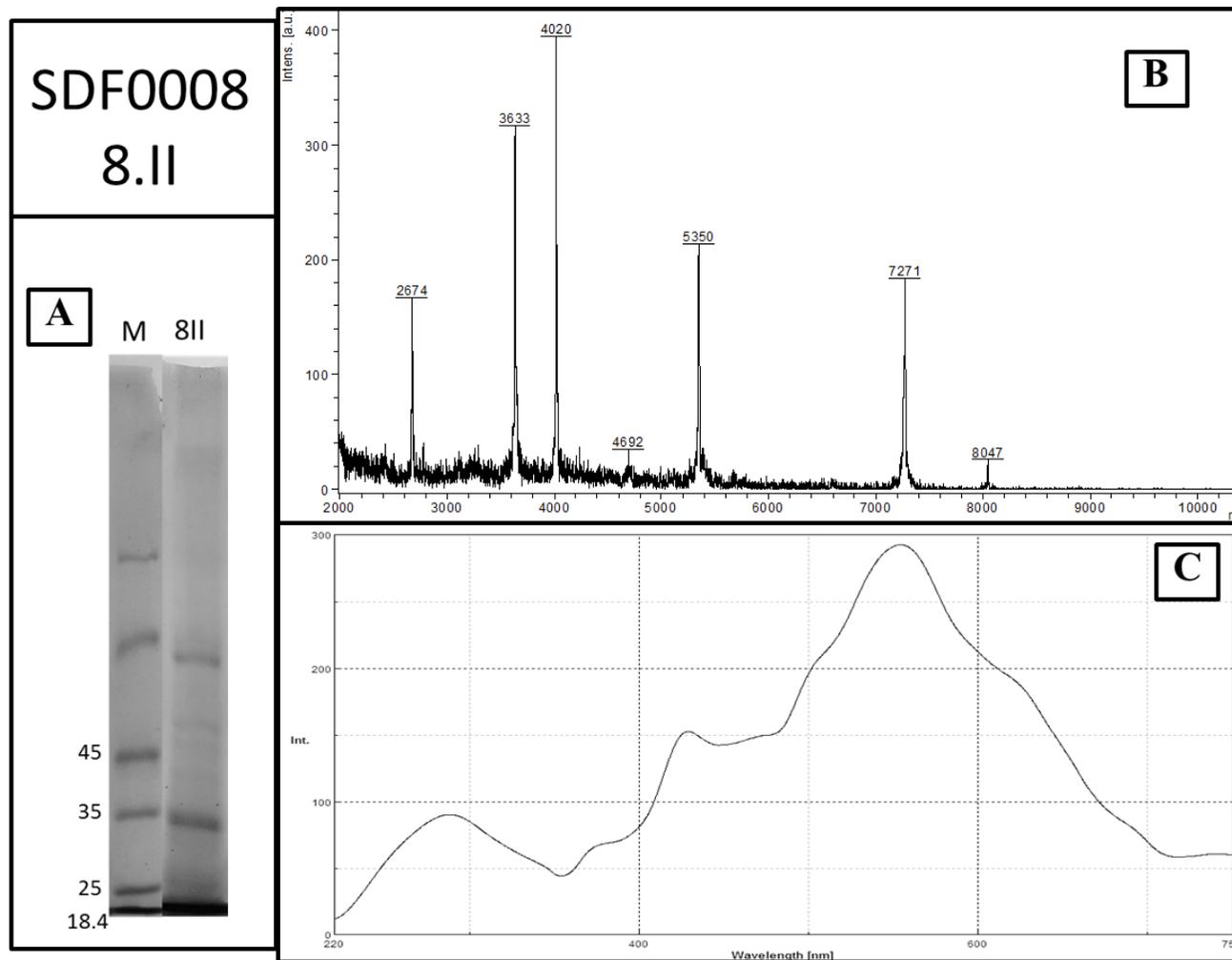


Figura 16. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

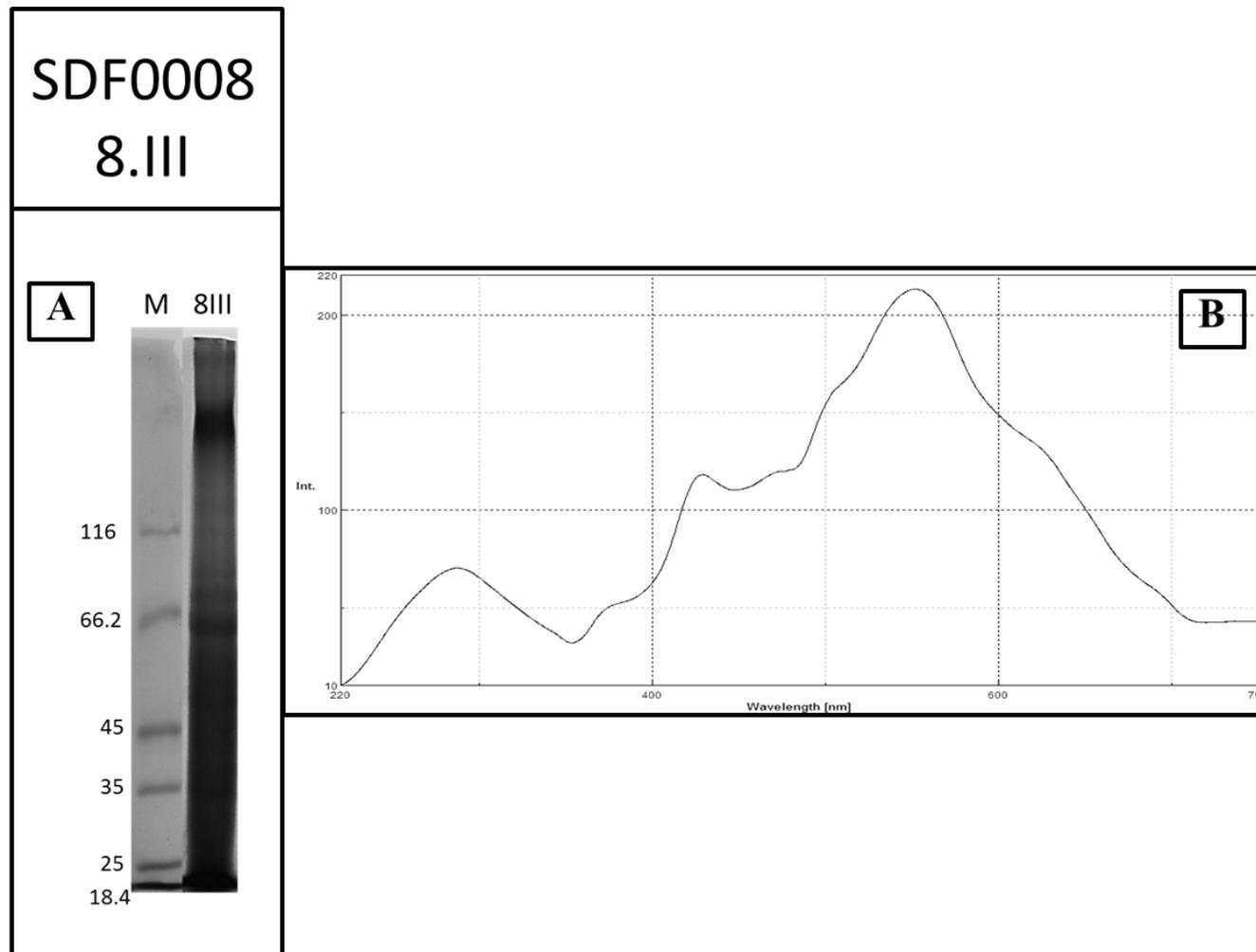


Figura 17. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE e **(B)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão. Não foi possível obter perfil de MALDI-TOF de 8.III

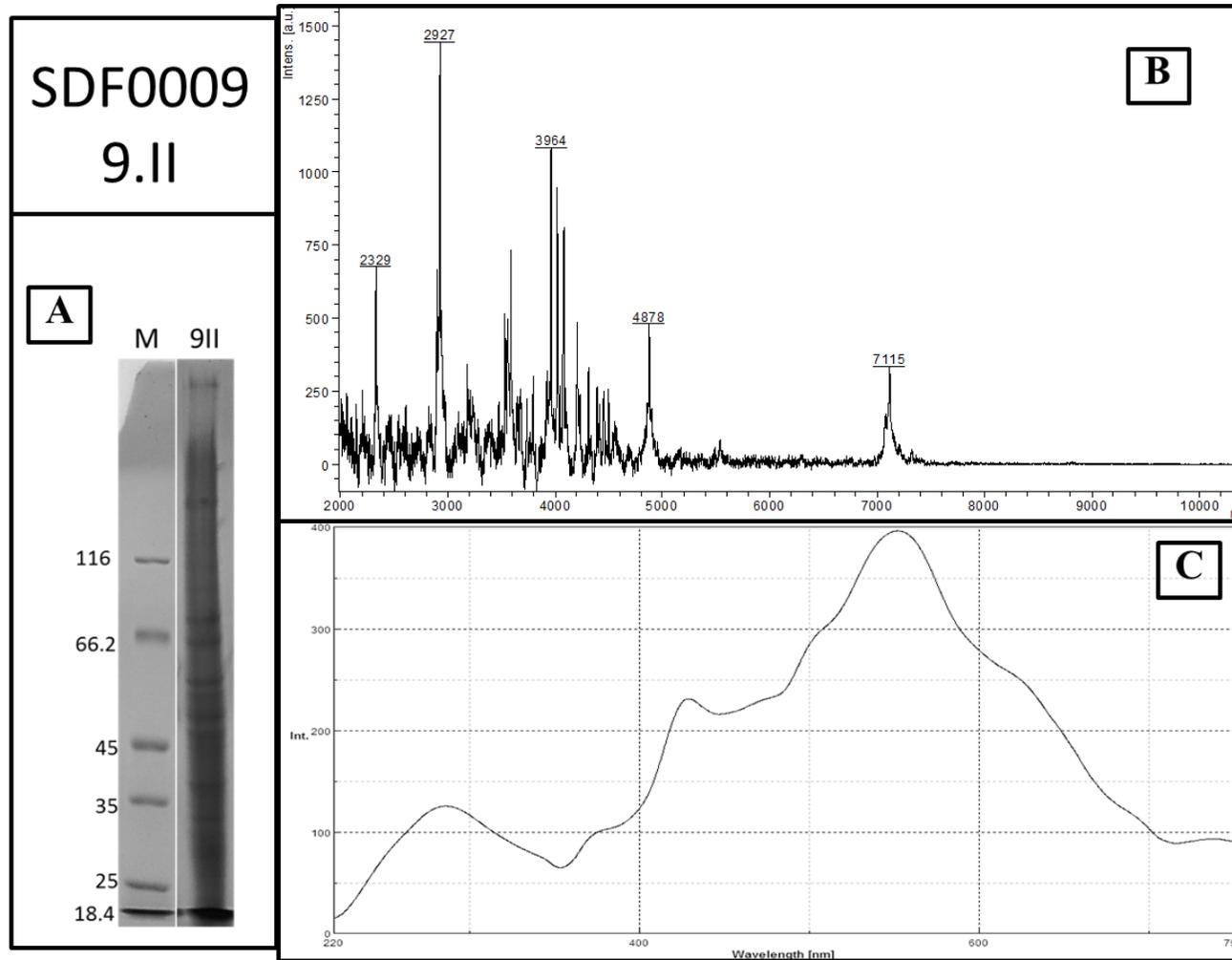


Figura 18. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

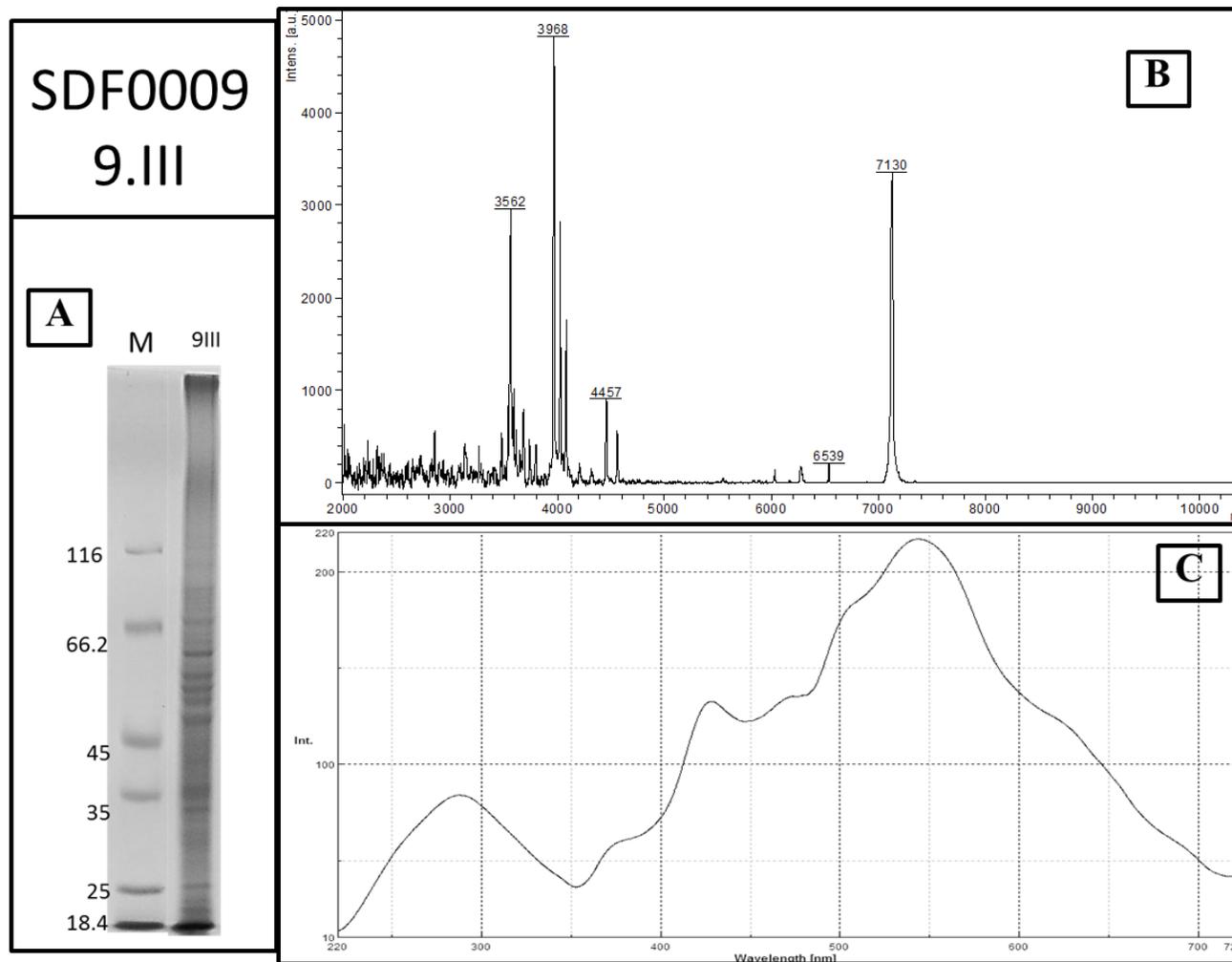


Figura 19. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

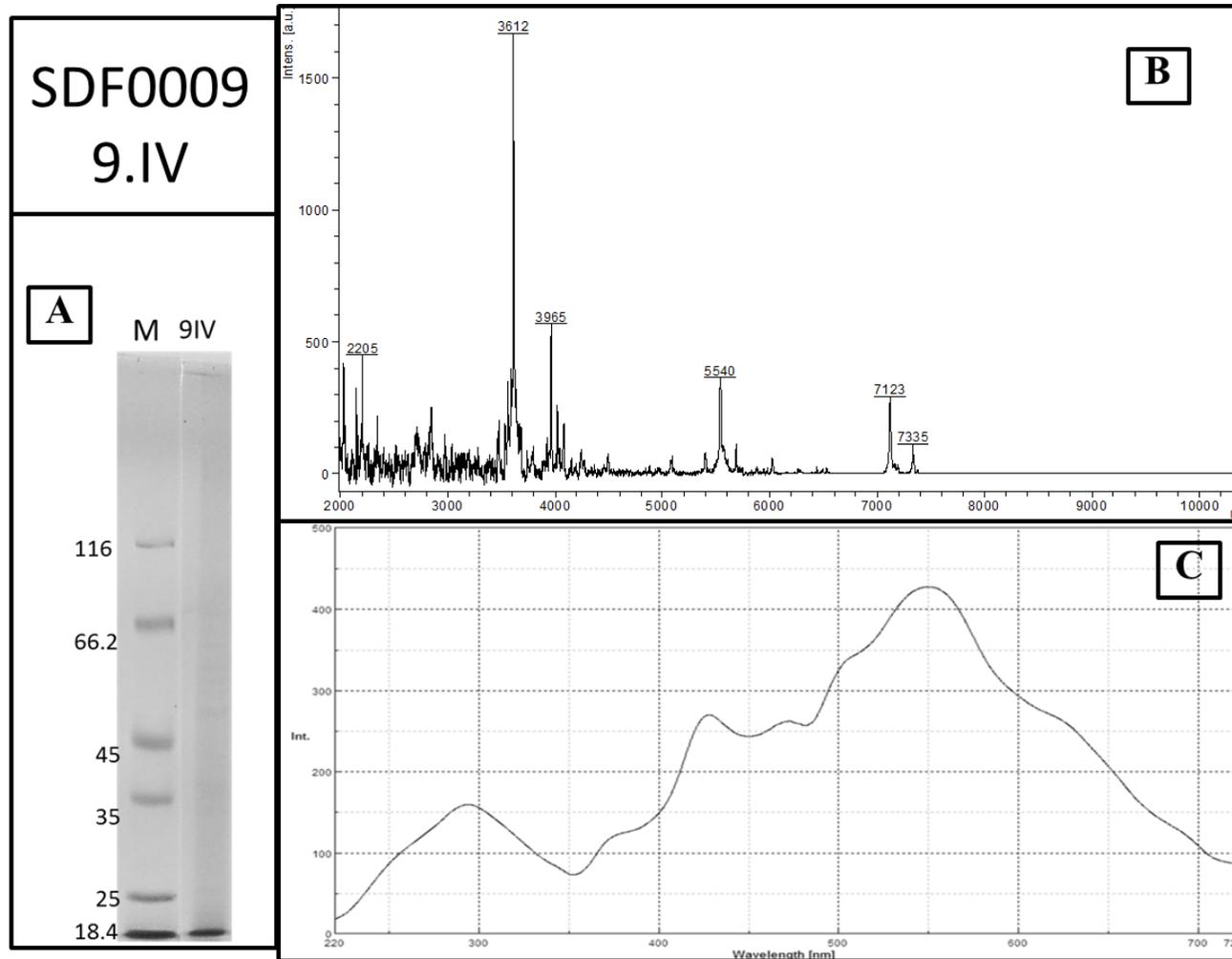


Figura 20. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

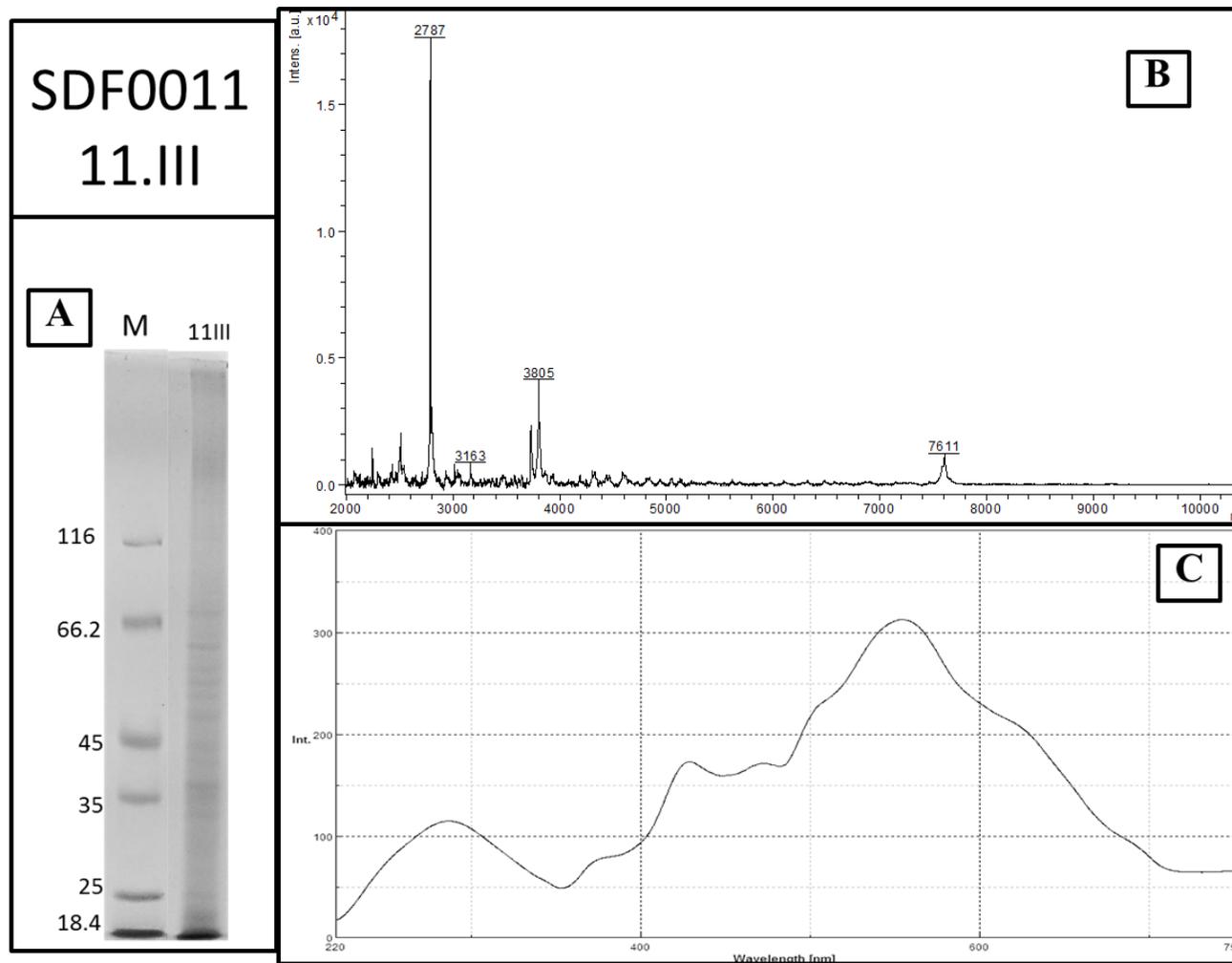


Figura 21. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

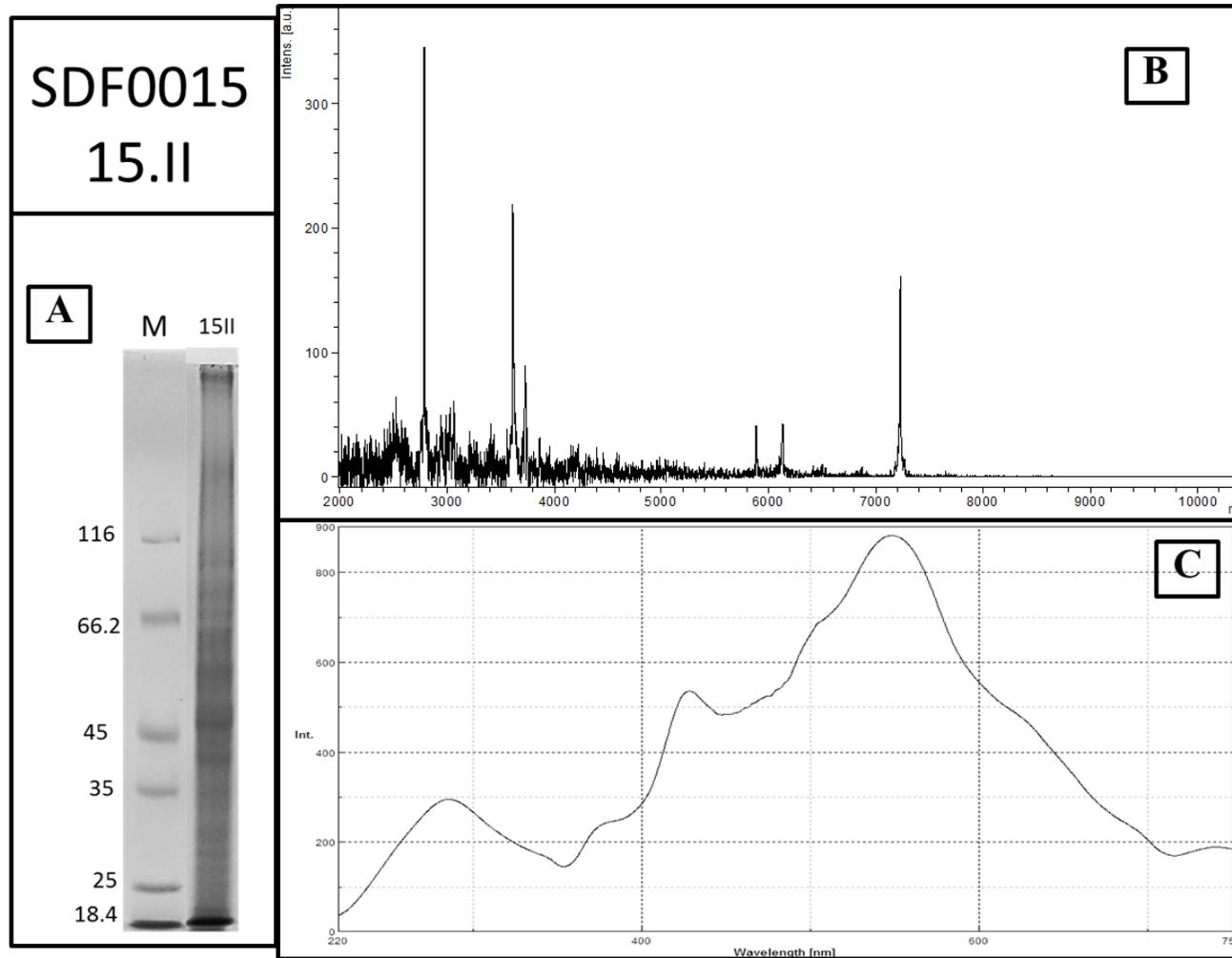


Figura 22. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

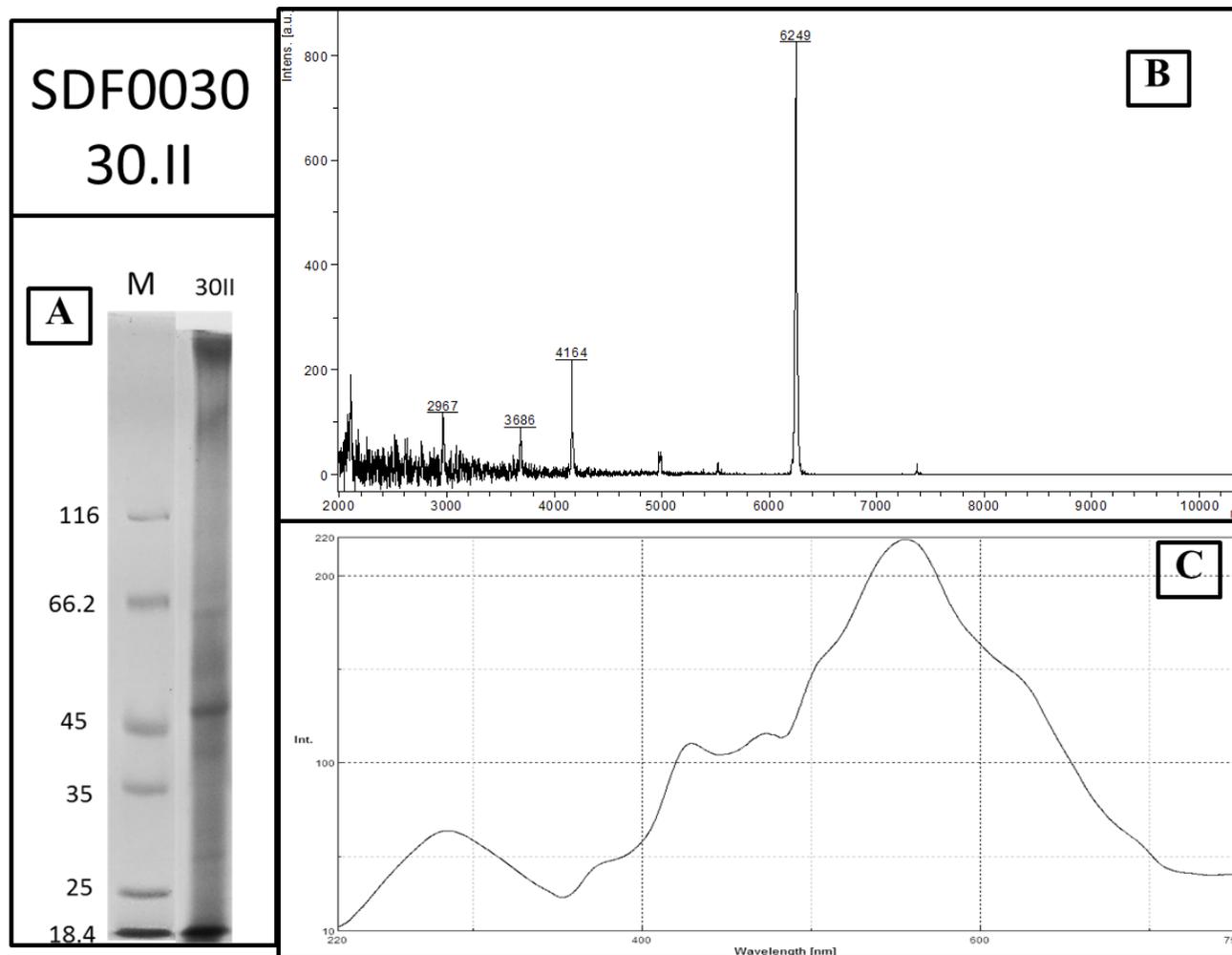


Figura 23. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

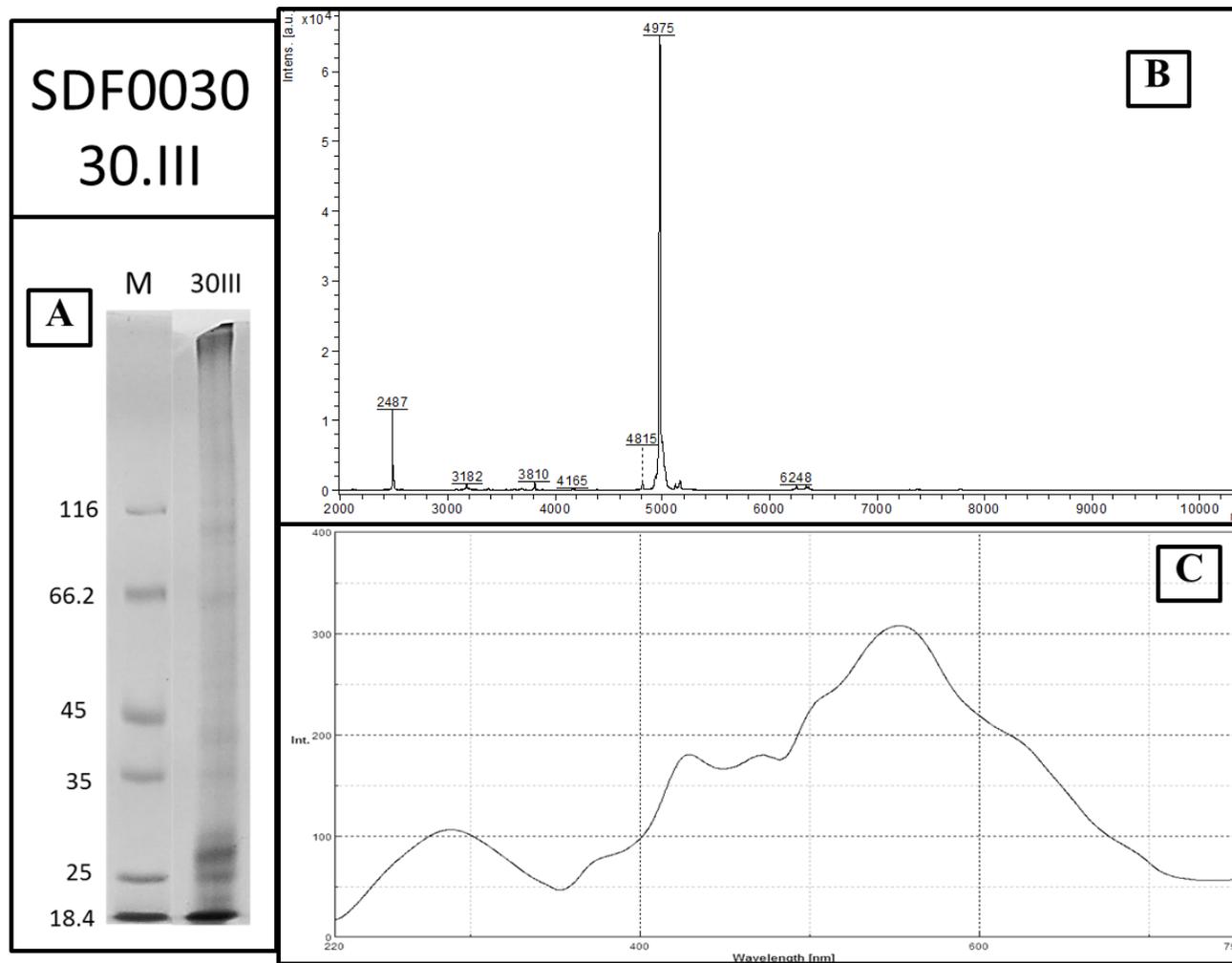


Figura 24. Caracterização de proteínas resolvidas em gradiente de sacarose. As bandas coletadas foram designadas com um algarismo arábico representando a linhagem SDF correspondente seguida de um algarismo romano correspondente ao número da banda coletada de gradiente de sacarose. Estão representados na figura **(A)** SDS-PAGE; **(B)** Espectrometria de massa por MALDI-TOF e **(C)** Espectro de absorção. As bandas máximas de absorção foram consideradas para obtenção dos espectros de emissão.

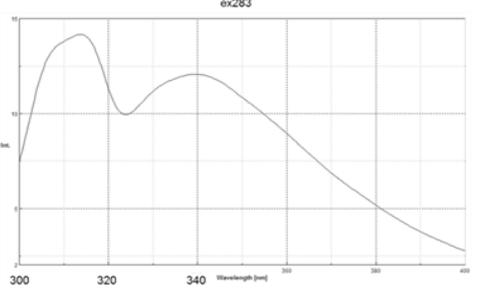
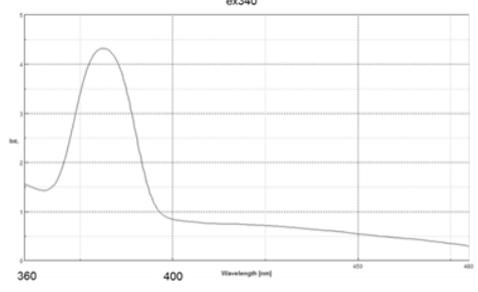
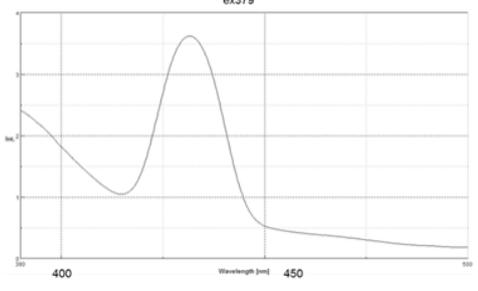
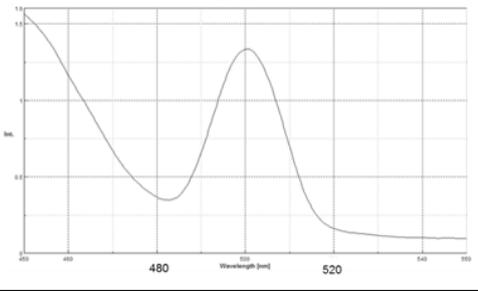
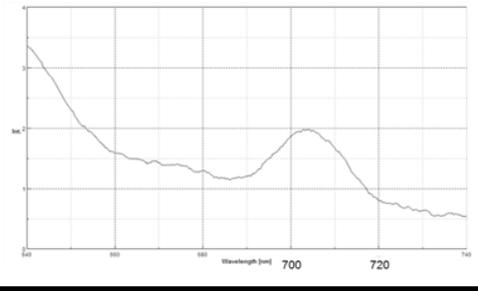
Amostra	Absorção (nm)	Emissão (nm)	Gráfico	Classe de fluoróforo
1.III	283	300-320		Tirosina
		320-360		Triptofano
1.III	340	360-400		Triptofano /Colágeno
1.III	379	400-450		Piridoxina/ FAD
1.III	430	480-520		Lipo-pigmentos/ FAD
1.III	632	700-720		Porfirinas

Figura 25. Fluoróforos identificados em bandas coletadas de gradiente de sacarose. Todos os picos encontrados em espectros de absorção foram testados quanto a emissão de fluorescência. A figura apresenta os espectros marcados como positivos para emissão comparados com sondas moleculares usuais e possíveis classes de fluoróforos.

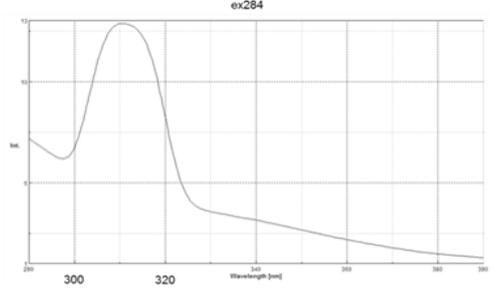
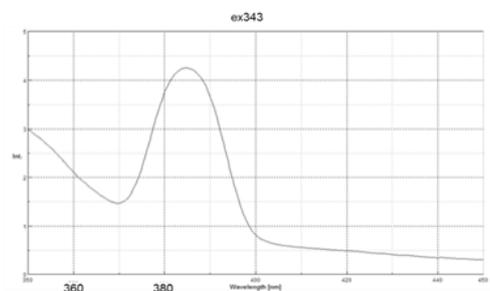
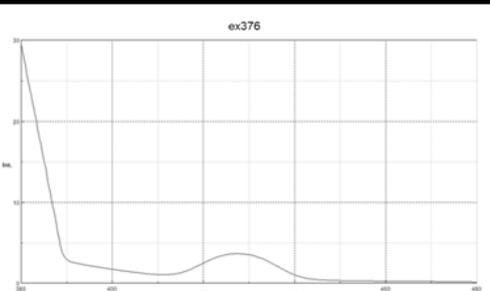
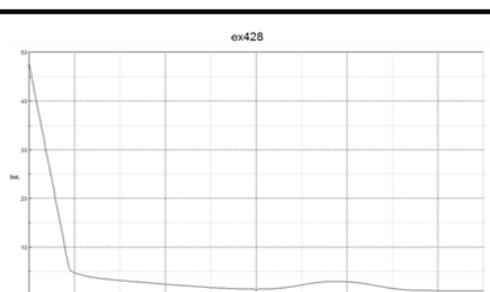
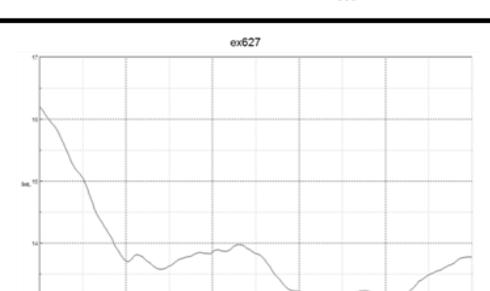
Amostra	Absorção (nm)	Emissão (nm)	Gráfico	Classe de fluoróforo
1.IV	284	300-320		Tirosina
1.IV	343	360-380		Triptofano
1.IV	376	420-440		Colágeno/ Piridoxina
1.IV	426	500		NADH
7.II	627	680		Porfirina

Figura 26. Fluoróforos identificados em bandas coletadas de gradiente de sacarose. Todos os picos encontrados em espectros de absorção foram testados quanto a emissão de fluorescência. A figura apresenta os espectros marcados como positivos para emissão comparados com sondas moleculares usuais e possíveis classes de fluoróforos.

Amostra	Absorção (nm)	Emissão (nm)	Gráfico	Classe de fluoróforo
8.II	286	300-320		Tirosina
		380-400		Piridoxina/ colágeno
9.II	284	300-320		Tirosina
9.II	551	540-560		FAD/ Lipopigmentos
11.III	286	300-340		Tirosina
30.III	288	300-340		Fenilalanina /Tirosina

Figura 27. Fluoróforos identificados em bandas coletadas de gradiente de sacarose. Todos os picos encontrados em espectros de absorção foram testados quanto a emissão de fluorescência. A figura apresenta os espectros marcados como positivos para emissão comparados com sondas moleculares usuais e possíveis classes de fluoróforos.

3 - Ultraestrutura de esporos por microscopia eletrônica de transmissão

O volume de dados atuais, relativos a características de superfície de esporos é ainda insuficiente para que essas sejam usadas como ferramentas taxonômicas definitivas. Entretanto, tais características são de grande auxílio quando tratamos da definição de espécies. Sabemos que apesar das demais diferenças entre espécies, a morfologia de esporângio — tamanho e formato da célula e aparência do citoplasma — e características fundamentais da ultraestrutura de esporos tendem a variar muito pouco, representando características definitivas da espécie em questão.

Com o objetivo de caracterizar ultraestruturalmente os esporos das linhagens SDF foi realizada microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essa abordagem é relativamente simples, entretanto, de extrema eficácia para determinar características internas e externas da ultraestrutura do esporo, que podem ser utilizadas para distinguir e identificar essas linhagens, bem como potencialmente fornecer dados sobre demais características fenotípicas.

Inicialmente o material contido nas bandas coletadas de gradiente de sacarose, do item 8 de material e métodos, correspondentes aos esporos seria utilizado para análise por MET e extração de proteínas de capa de esporos. Entretanto, notou-se que grande parte dos esporos germinava durante o preparo para análise. Por esta razão, utilizamos amostras de cultura esporulada para essas abordagens. Portanto, esses resultados sugerem que o gradiente de sacarose não é recomendado para purificação de esporos para esse tipo de análise. Outro tipo de gradiente deve ser utilizado, por exemplo, o gradiente de Renografin é uma alternativa (Nicholson e Setlow, 1990).

Com o intuito de potencializar a observação de diferentes estruturas internas e externas, dois tipos de contrastadores foram utilizados (Figuras 28 a 44A). A análise com diferentes contrastadores permitiu ainda selecionar o tipo de contrastador mais adequado para cada linhagem SDF, de acordo com a capacidade dos mesmos em mostrar mais estruturas ou permitir melhor visualização da amostra.

O acetato de uranila em combinação com tetróxido de ósmio, considerado padrão para MET, foi o primeiro contrastador utilizado. O contraste com uranila se mostrou eficaz para visualização de componentes estruturais mais internos dos esporos, sendo considerado de maior eficácia em esporos com estruturas externas menos complexas e para visualização de componentes estruturais comuns a todos os esporos (núcleo, córtex e capa). O segundo contrastador utilizado foi o vermelho de rutênio em combinação com tetróxido de ósmio. Este contrastador é considerado inespecífico, contudo apresenta afinidade por estruturas externas,

o que foi comprovado neste trabalho, conforme descrição a abaixo.

Duas linhagens — SDF0005 (Figura 30) e SDF0029 (Figura 39)— foram melhor contrastadas por rutênio, já que essa técnica permitiu a visualização de estruturas fundamentais não evidenciadas durante a caracterização com acetato de uranila. Outras linhagens, como SDF0049 e FT9 apresentaram determinadas estruturas externas apenas quando contrastadas com rutênio. No entanto, a visualização de estruturas internas foi comprometida durante esta técnica, sendo recomendada a análise com os dois contrastadores (Figuras 43 e 44A).

De um modo geral, a contrastação com uranila nos esporos das linhagens SDF0001 (Figura 28A); SDF0002 (Figura 29A); SDF0011 (Figura 34A); SDF0013 (Figura 35A) e SDF0024 (Figura 38A) permitiu a visualização de estruturas internas, superior à contrastação com vermelho de rutênio. Notavelmente, esporos da linhagem SDF0024 apresentaram uma bi-camada de exósporo (Figura 38A), sendo melhor observados com a contrastação em uranila. Isso pode ser devido a maior afinidade do vermelho de rutênio com estruturas externas, o que dificulta a visualização de um esporo que apresentou maior número das mesmas. Nas demais linhagens SDFs, ambas as contrastações permitiram a visualização adequada e equiparável de estruturas. Desta forma, a utilização de dois contrastadores foi considerada eficaz para esse tipo de abordagem, onde o objetivo foi a caracterização estrutural generalizada de estruturas internas e externas.

A análise de dados de morfologia de esporos representa uma etapa importante, ainda que inicial, para a compreensão da montagem e funções dessas estruturas, além de, uma série de informações taxonômicas importantes. Uma vez que o objetivo dessa abordagem é fornecer dados, que colaborem com uma taxonomia multifásica e não a elaboração de afirmativas por si só, esses resultados levaram a elaboração de determinadas hipóteses taxonômicas preliminares, como discutidas a seguir.

As linhagens SDF0015; SDF0021; SDF0047 e SDF0049 apresentaram morfologia típica de *B. megaterium* (Figuras 36, 37, 42 e 43A, respectivamente). As linhagens SDF0001; SDF0011 e SDF0013 apresentaram morfologia típica de *B. subtilis* (Figuras 28, 34 e 35A, respectivamente). As linhagens SDF0002; SDF0007; SDF0030 e FT9 apresentaram morfologia típica de *B. cereus* (Figuras 29, 31, 40 e 44A, respectivamente). As linhagens SDF0005; SDF0008 e SDF0042 apresentaram um exósporo longo (Figuras 30, 32 e 41A, respectivamente), similar ao relatado para esporos de espécies dos gêneros *Lysinibacillus* e *Paenibacillus* (Holt *et al.*, 1975; Ahmed *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009) — embora a não formação de colônias rizoides não corroboram a segunda suposição. A linhagem SDF0029

apresenta estrutura externa estrelada (Figura 39A) similar ao relatado em *Paenibacillus* (Kim *et al.*, 2009), embora a morfologia de colônias não rizoides e a fenda encontrada no núcleo não corroborem essa interpretação.

O *B. thuringiensis* é mundialmente conhecido por apresentar atividade citolítica e entomocida. Essa atividade ocorre, principalmente, pela presença de inclusões proteicas parasporais (Agaisse e Lereclus, 1995; Crickmore *et al.*, 1998; Aronson, 2002; Crickmore *et al.* 2008). A linhagem SDF0030 apresentou uma estrutura semelhante a um cristal parasporal, com uma estrutura atípica similar a um envoltório membranoso, corroborando os dados que aproximem essa linhagem SDF com *B. thuringiensis*. Cristais parasporais ainda foram observados para as linhagens SDF0002 e SDF0011 (morfologia cuboide; Figuras 29 e 34A, respectivamente); linhagem SDF0049 (formato não definido; Figura 43A) e as linhagens SDF0005 e SDF0024, que produzem inclusões com morfologia esférica (Figuras 30 e 38A, respectivamente). É importante ressaltar que, em adição a presença de inclusões parasporais em *B. thuringiensis*, estas são frequentemente relatadas em outras espécies de Bafes (Zhang *et al.*, 1998). Portanto, a presença dessas inclusões por si só não garantem que estas linhagens pertençam à espécie *B. thuringiensis*.

4 - Composição proteica de capa de esporo de linhagens SDFs

Muitas questões importantes sobre os mecanismos de montagem de estruturas externas em esporos ainda não são bem explicadas. Por exemplo, se a função do esporo é resistir a estresses ambientais universais, então porque essa estrutura é tão variável? A resolução dessa questão é extremamente complexa, em razão da grande diversidade de estruturas externas entre espécies. Desta forma, parece razoável especular que essa diversidade é dirigida pela adaptação a diversos nichos (Driks, 2007; Nial e Halket, 2011).

Considerando que a superfície do esporo representa a interface entre essa célula e o ambiente, ou seja, define o alcance de interações estabelecidas com outros organismos e superfícies, a diversidade morfológica e da composição dessas estruturas desempenham papel fundamental na definição de nichos ecológicos em Bafes (McKenney *et al.*, 2013) e, possivelmente, contribuem com a ampla dispersão desse grupo pelos vários tipos de ambientes (Giorno *et al.*, 2007).

Outra questão ainda não resolvida refere-se ao nível em que redes complexas de interação de proteínas são características comuns entre esporos de outras espécies não modelo. É importante nos questionarmos até que nível proteínas conservadas apresentam

funções similares e até que nível a diversidade da composição proteica influencia no fenótipo e, conseqüentemente, nas adaptações a diversos ambientes. Comparar composição proteica e rede de montagem de proteínas de capa com espécies modelo, como *B. subtilis*, pode fornecer informações quanto ao nível de conservação dessas proteínas e as redes de montagem interespecies. Esses dados podem favorecer a compreensão dos fenômenos observados em capas de esporos de *B. subtilis* são aplicáveis a outras Bafes não modelos.

Com o intuito de analisar o perfil preliminar de proteínas de capa de esporo, a porção solúvel da capa foi removida por uma série de quebras mecânicas em condições desnaturantes. É importante ressaltar que as proteínas que compõem a porção insolúvel da capa de esporos, e que não podem ser extraídas por essa metodologia, e por esta razão, foram desconsideradas para esse trabalho.

A técnica utilizada para esta análise trata-se de uma abordagem padrão, aplicada rotineiramente para linhagens modelo de *B. subtilis* e *B. anthracis* (Driks, com. pessoal). Os resultados das análises de extração de proteínas de capa de esporo estão apresentados nas figuras 28 a 40B. Os dados obtidos mostram que a metodologia utilizada para extração dessas proteínas não é eficaz para todas as linhagens de Bafes, sendo que método foi incompatível com 25% das linhagens analisadas (Figuras 30, 32, 33 e 40B). Mesmo em diversas linhagens onde foi possível fazer extração de frações solúveis da capa, os resultados não compactuam com o esperado, pois apenas algumas poucas proteínas puderam ser observadas, enquanto que para *B. subtilis* são visualizadas até 70 bandas correspondentes a diferentes proteínas em gel. Adaptações da técnica de extração de frações solúveis devem ser formuladas caso a caso, de acordo com necessidades individuais das diferentes linhagens SDFs e, também, representa uma perspectiva e abertura de uma nova linha de pesquisa.

Conforme mencionado anteriormente, quando proteínas de capa de esporo em *B. subtilis* são analisadas por SDS-PAGE, as proteínas produzidas em maior quantidade apresenta massa molecular abaixo de 14,4 kDa e a maior diversidade de proteínas exibe massa molecular entre 21,5 e 63,3 kDa (Lai *et al.*, 2003). Os resultados obtidos são coerentes quanto a essa informação, já que mesmo em linhagens SDF notadamente diferenciadas de *B. subtilis* as proteínas analisadas, em sua maioria, apresentaram essa faixa de massa molecular. Algumas exceções foram observadas, como no caso da linhagem SDF0015 (Figura 36B) onde proteínas identificadas apresentam massa molecular superior a 116 kDa, em *B. subtilis* as proteínas tipicamente são limitadas à faixa de até 63,3 kDa. Diversos resultados mostram ainda bandas únicas, sugerindo que embora a técnica necessite ser otimizada para acomodar

as diferenças fenotípicas entre as linhagens SDF e os modelos, a técnica pode ser eficaz para extração de algumas proteínas individuais para análises futuras.

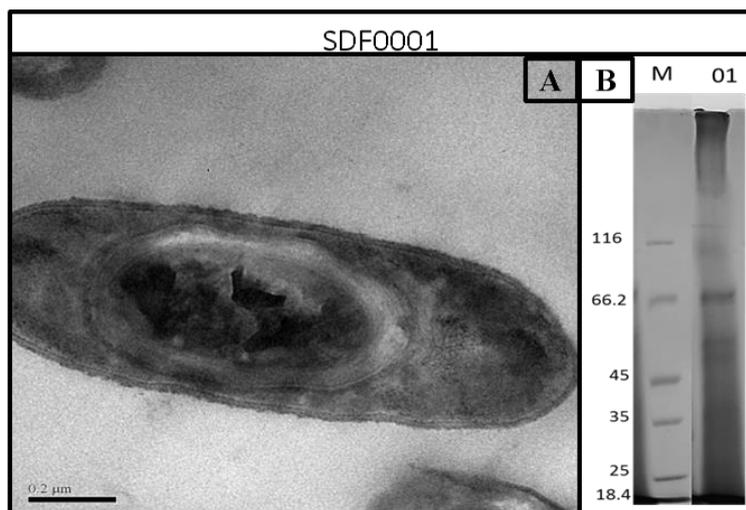


Figura 28. Análise de esporo da linhagem SDF0001. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. O pré-esporo ocupa cerca de 2/3 do esporângio. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular entre 35 e 66,2 kDa.

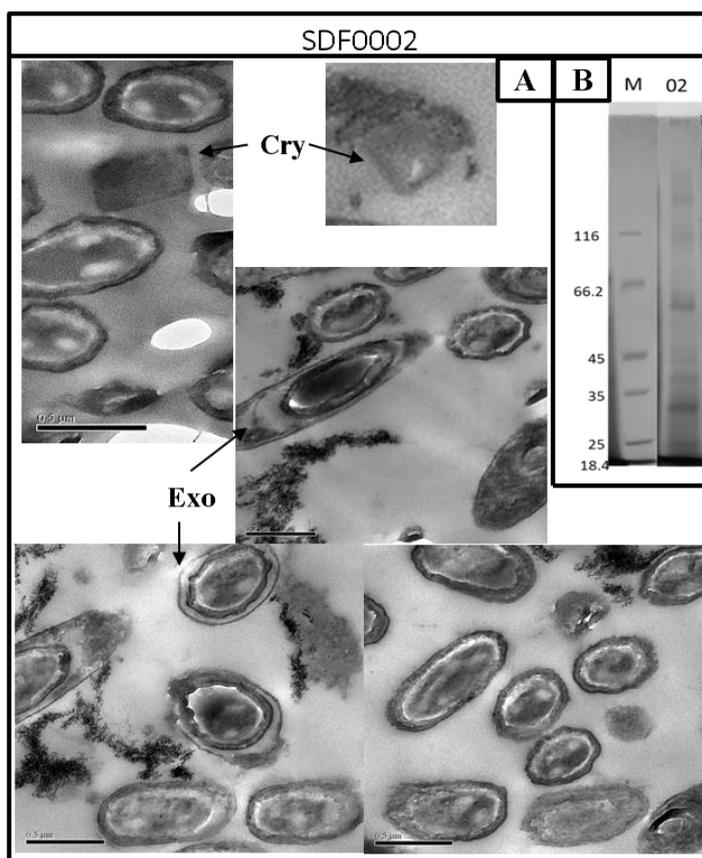


Figura 29. Análise de esporo da linhagem SDF0002. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Cristais parasporais (**Cry**) de morfologia cubóide foram observados. A linhagem apresenta ainda um exósporo (**Exo**) com ligação à célula aparentemente fraca pois apesar da constatação da presença de exósporo dentro do esporângio e em alguns esporos livres, vários outros esporos foram observados sem essa camada. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular entre 45 e 25 kDa.

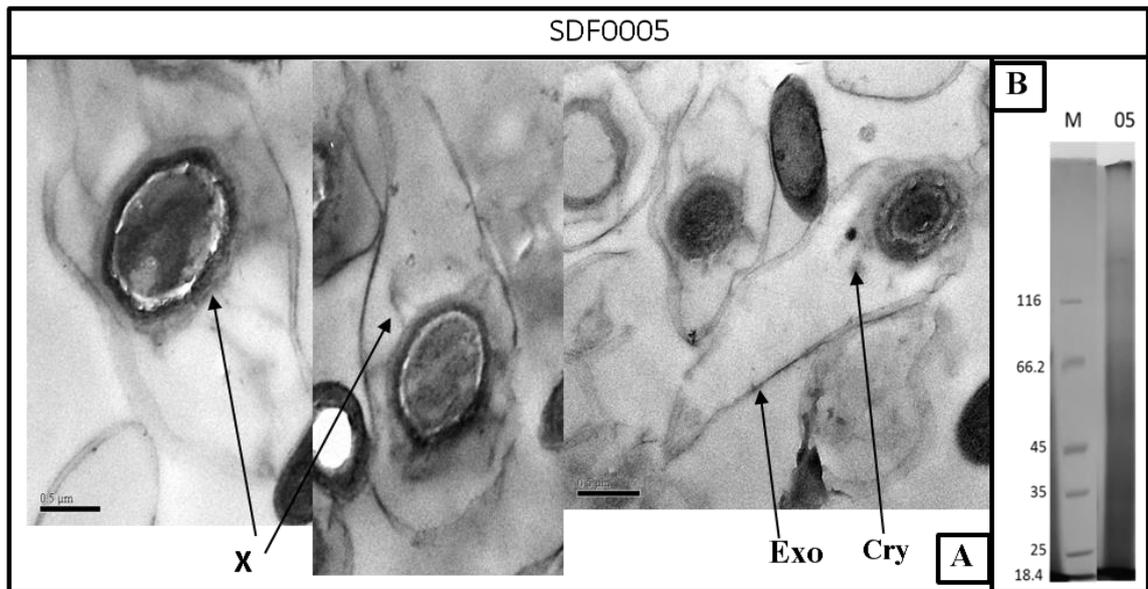


Figura 30. Análise de esporo da linhagem SDF0005. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Inclusões similares a cristais (Cry) de morfologia esférica foram observadas. A linhagem apresenta ainda um exósporo (Exo) atipicamente longo. Observou-se ainda a presença de uma estrutura frouxa em formato estrelado (X) localizada entre o exósporo e a capa externa. Contrastação por acetato de uranila. A técnica de extração de proteínas de capa de esporo não foi eficaz para essa linhagem e precisa ser melhor adaptada para análise.

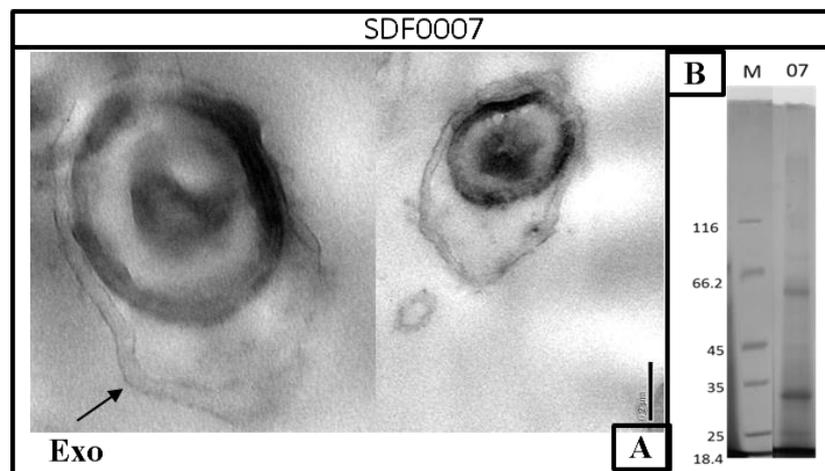


Figura 31. Análise de esporo da linhagem SDF0007. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. A linhagem apresenta um exósporo (Exo) aparentemente bi-camada. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular entre 18 e 66,2 kDa.

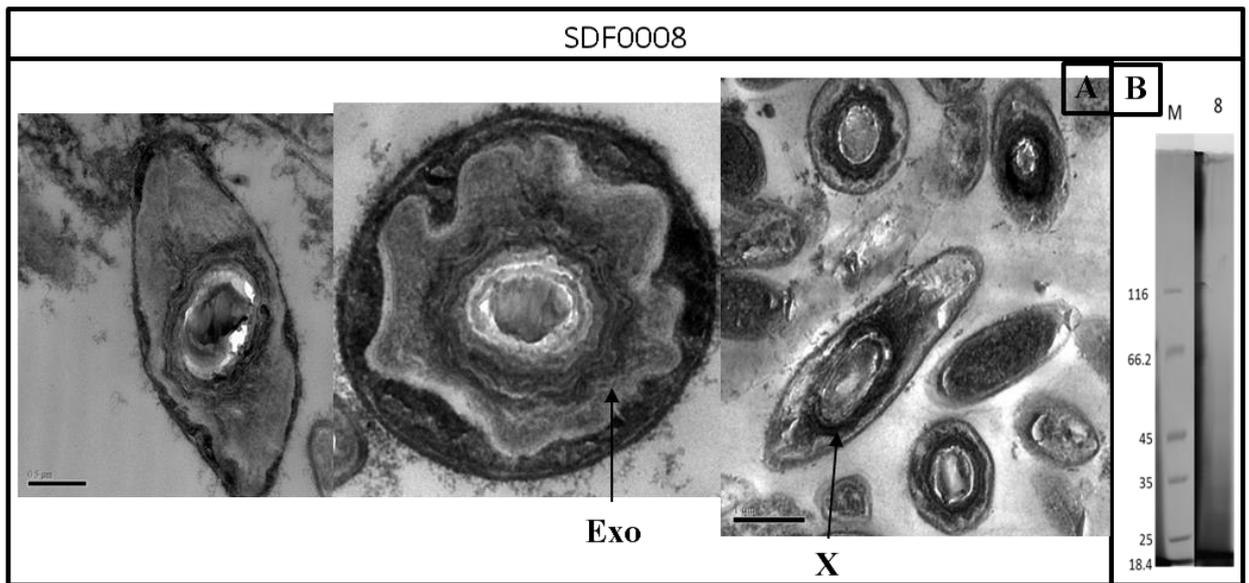


Figura 32. Análise de esporo da linhagem SDF0008. Estão representados na figura **A**. MET e **B**. Proteínas de capa de esporo. A linhagem apresenta um exósporo (**Exo**) atipicamente longo. Observou-se ainda a presença de uma estrutura externa à capa (**X**) que se contrasta fortemente com vermelho de rutênio. Contrastação por vermelho de rutênio. A técnica de extração de proteínas de capa de esporo não foi eficaz para essa linhagem e precisa ser melhor adaptada para análise.

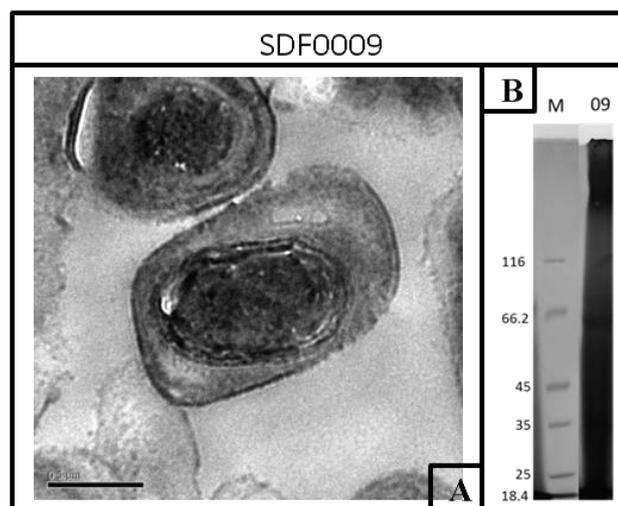


Figura 33. Análise de esporo da linhagem SDF0009. Estão representados na figura **A**. MET e **B**. Proteínas de capa de esporo. Contrastação por acetato de uranila. A técnica de extração de proteínas de capa de esporo não foi eficaz para essa linhagem e precisa ser melhor adaptada para análise.

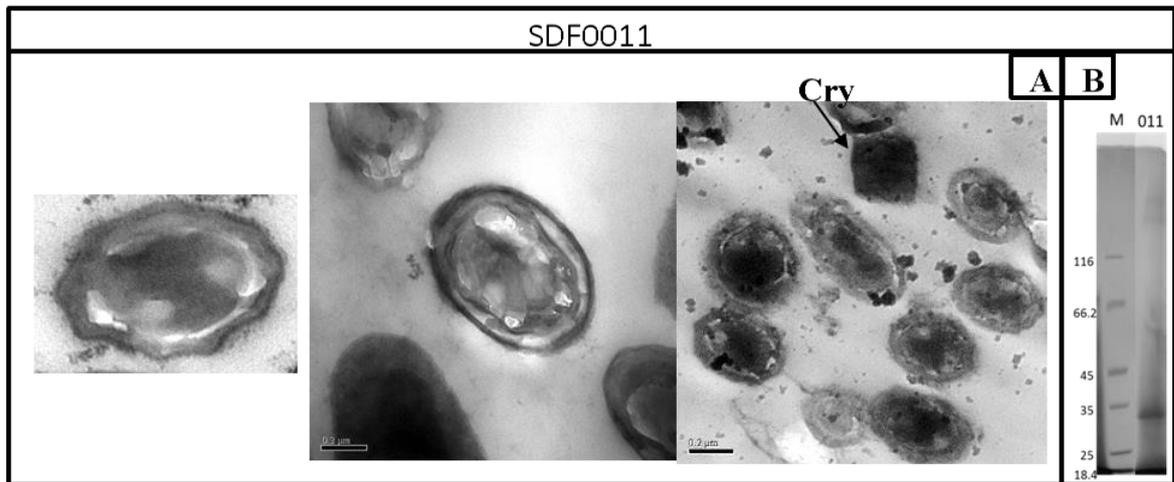


Figura 34. Análise de esporo da linhagem SDF0011. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Cristais parasporais (Cry) de morfologia cubóide foram observados. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular abaixo de 35kDa.

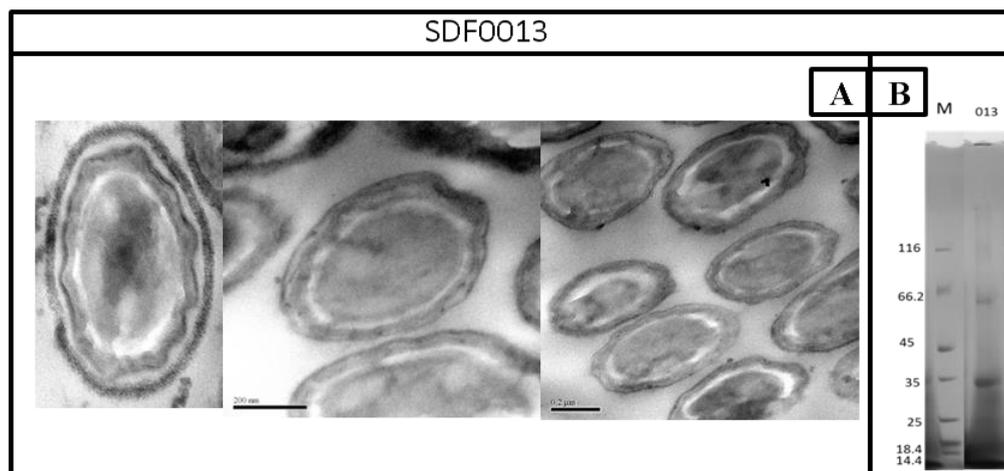


Figura 35. Análise de esporo da linhagem SDF00012. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular entre 35 e 66,2 kDa.

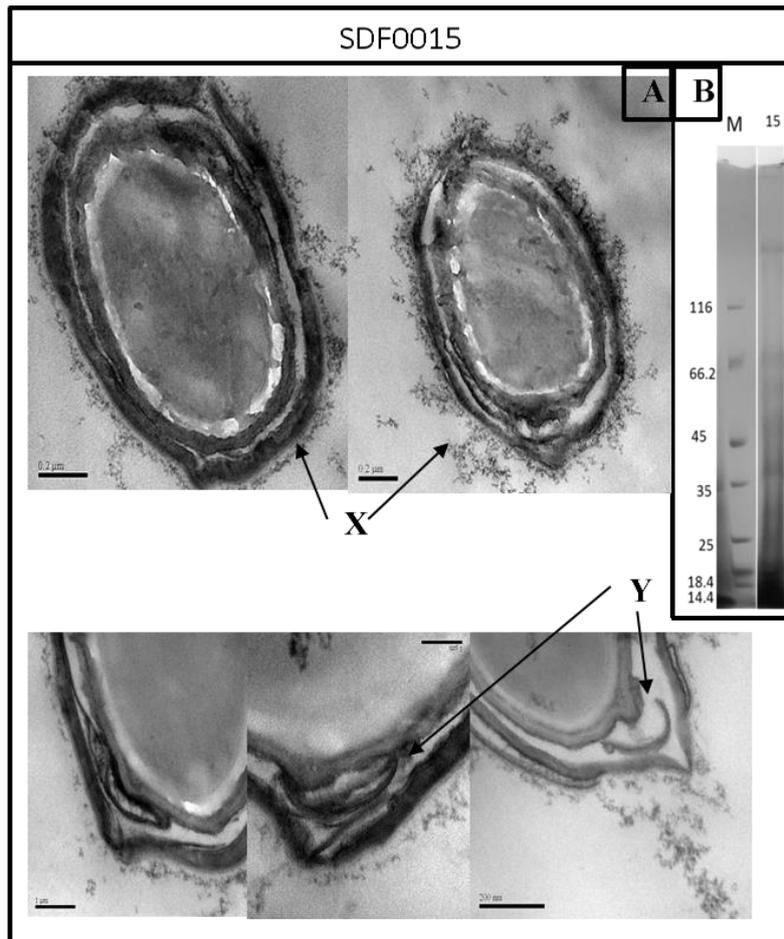


Figura 36. Análise de esporo da linhagem SDF0015. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. A linhagem apresenta uma estrutura desprendendo-se entre a capa e o exósporo (Y). Foi observado ainda um grande número de partícula granulosas circulando o exósporo (X). Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas Várias proteínas puderam ser identificadas apresentando massa molecular entre 14,4 e 116 kDa.

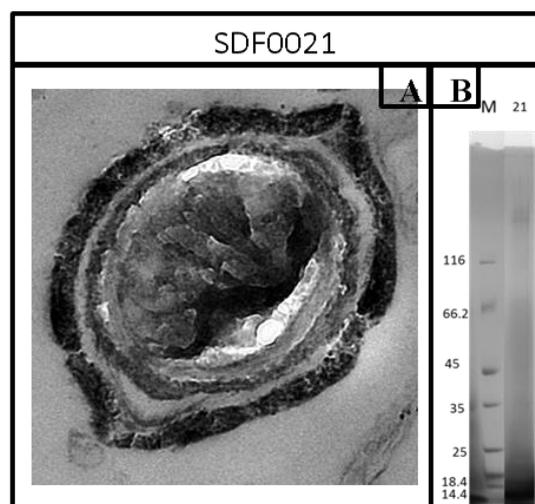


Figura 37. Análise de esporo da linhagem SDF0021. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular acima de 116 kDa.

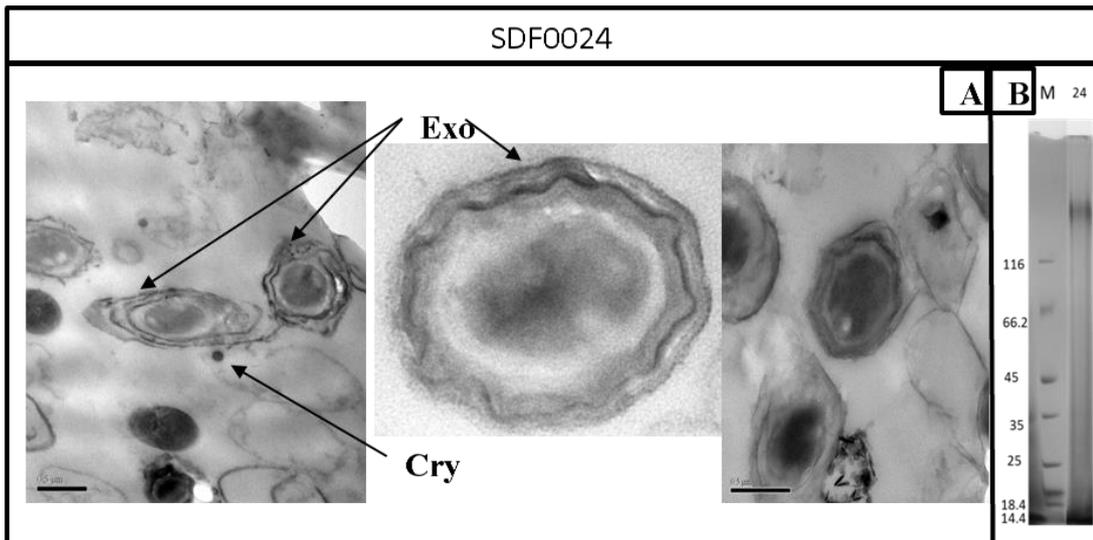


Figura 38. Análise de esporo da linhagem SDF0024. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Inclusões similares a cristais (Cry) de morfologia esférica foram observadas. A linhagem apresenta ainda um exósporo (Exo) multicamada visível em diferentes direções de cortes. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular acima de 116 kDa.

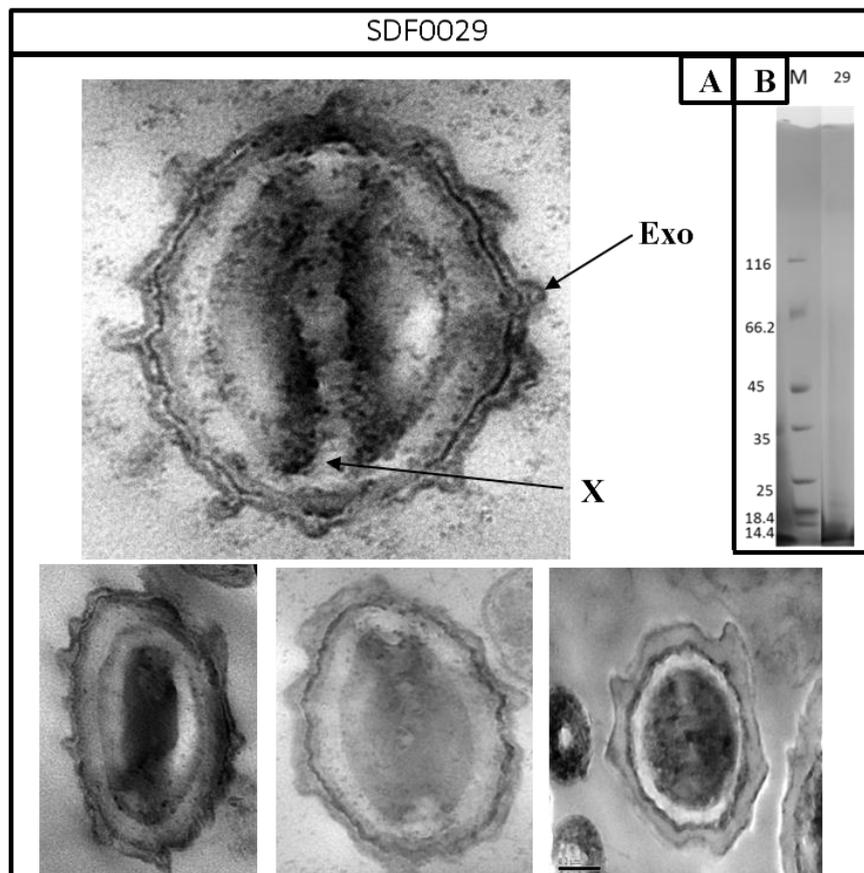


Figura 39. Análise de esporo da linhagem SDF0029. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Observou-se uma fenda (X) na parte interna do núcleo do esporo. A linhagem apresenta ainda uma morfologia estrelada de exósporo (Exo). Contrastação por vermelho de rutênio. A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular abaixo de 25 kDa.

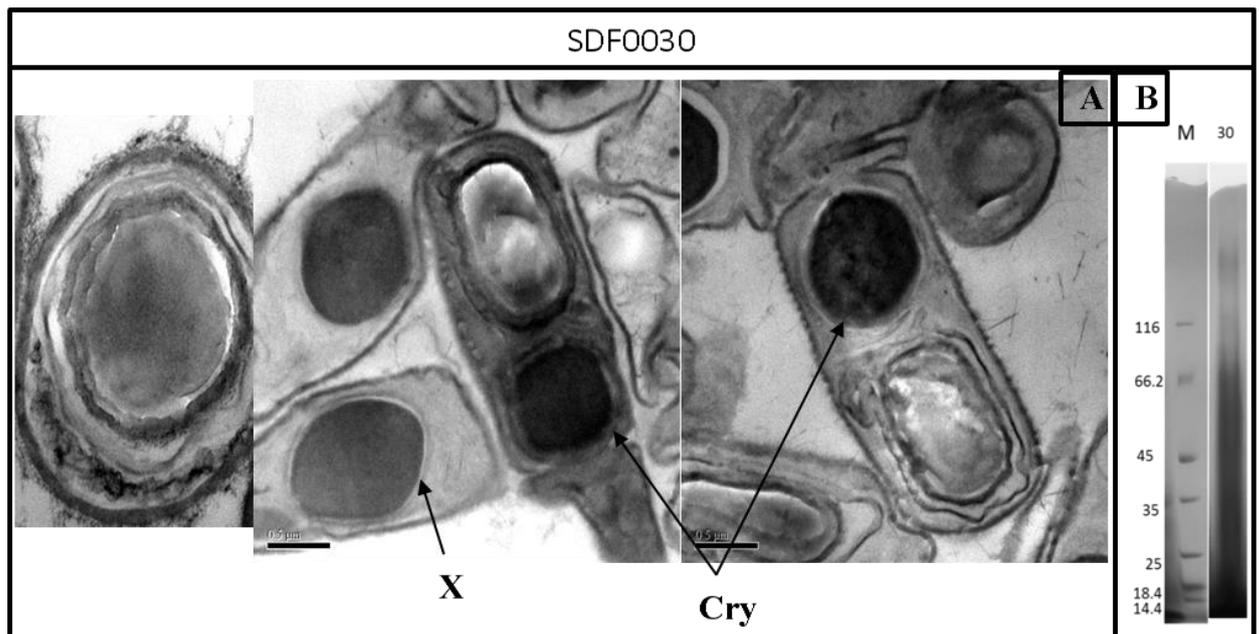


Figura 40. Análise de esporo da linhagem SDF0030. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. A linhagem apresentou uma estrutura semelhante a um cristal parasporal (**Cry**), com uma estrutura atípica similar a um envoltório membranoso (**X**). Contrastação por acetato de uranila. A técnica de extração de proteínas de capa de esporo não foi eficaz para essa linhagem e precisa ser melhor adaptada para análise.

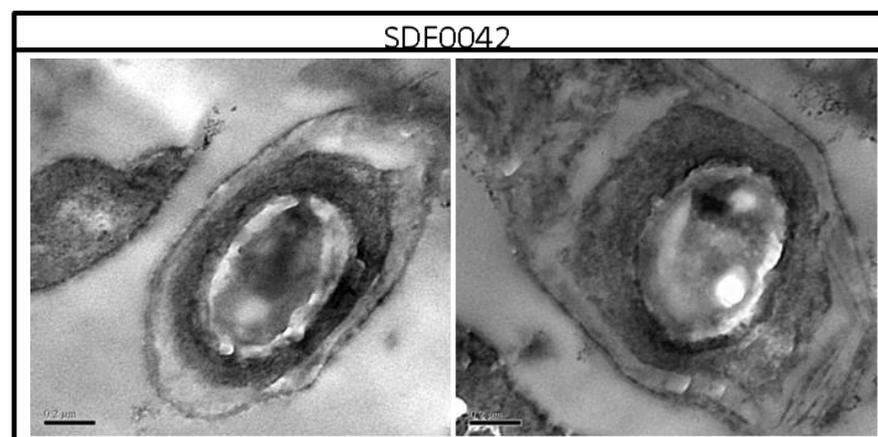


Figura 41. Análise de esporo da linhagem SDF0042. Está representado na figura MET. Contrastação por acetato de uranila.

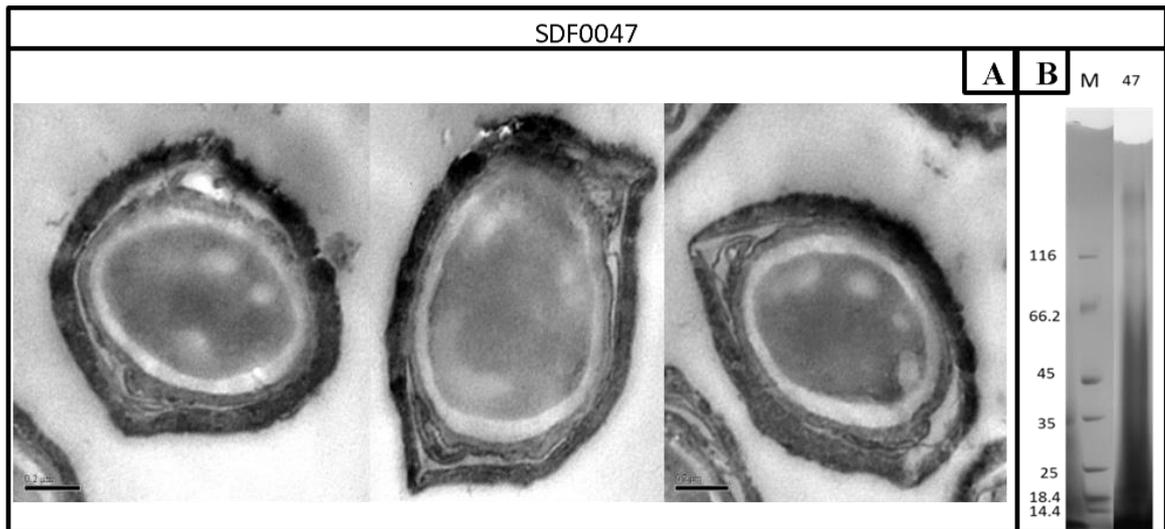


Figura 42. Análise de esporo da linhagem SDF0047. Estão representados na figura (A) MET e (B) Proteínas de capa de esporo. Contrastação por acetato de uranila. A maior parte das proteínas A maior parte das proteínas identificadas apresenta massa molecular próxima e acima de 116 kDa e entre 14,4 e 18,4 kDa.

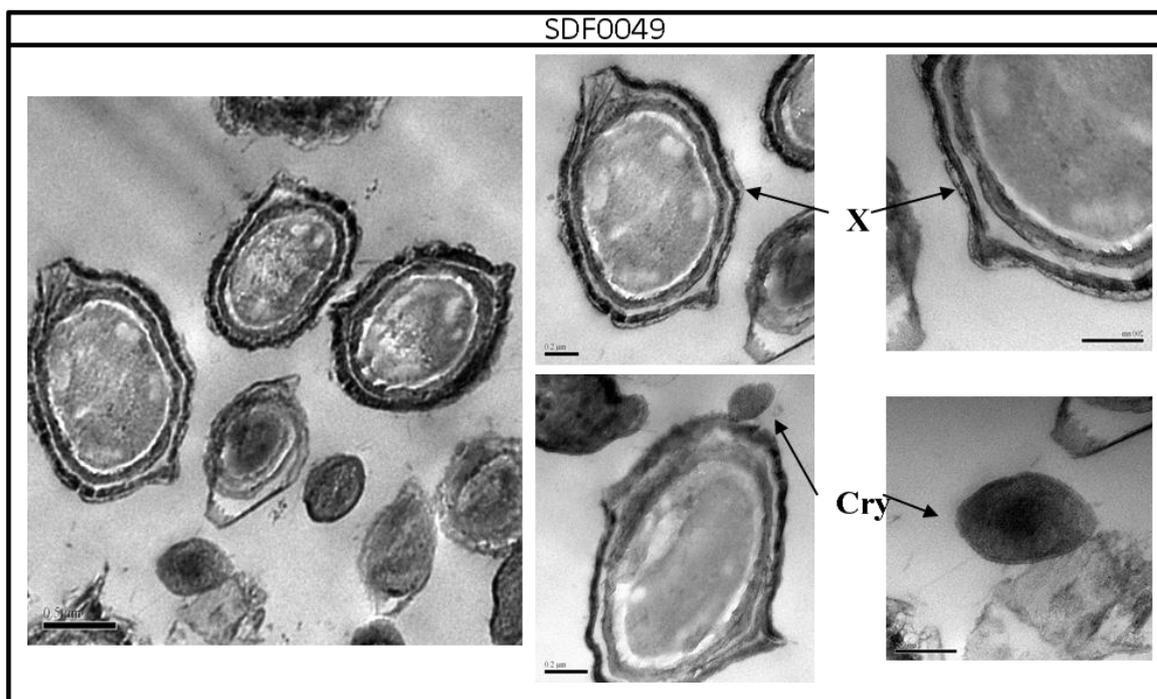


Figura 43. Análise de esporo da linhagem SDF0049. Está representados na figura MET. Cristais parasporais (**Cry**) de morfologia não definida foram observados. A linhagem apresenta ainda uma pequena membrana externa ao exósporo (**X**). Contrastação por acetato de uranila e vermelho de rutênio.

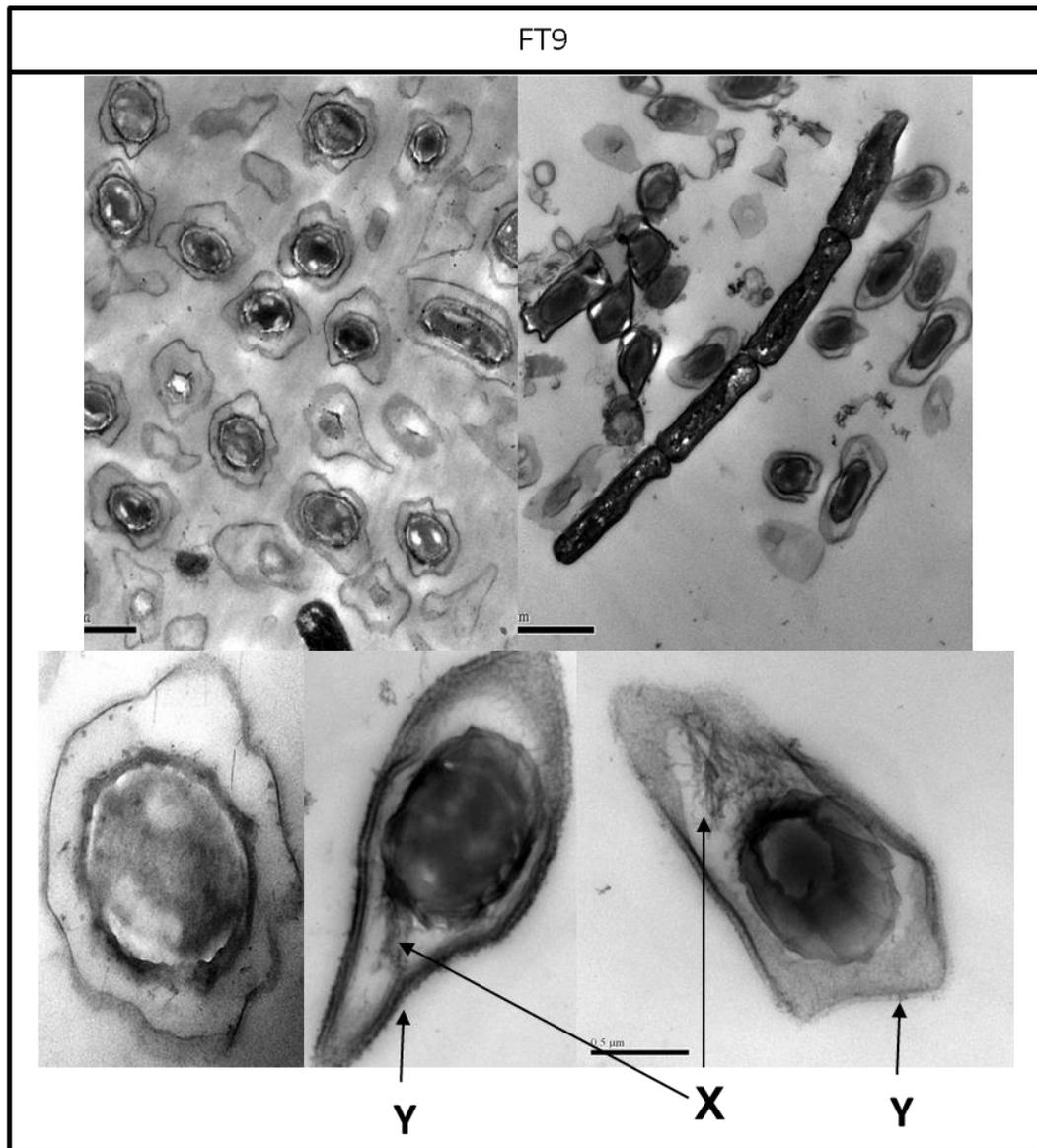


Figura 44. Análise de esporo da linhagem FT9. Quando contrastado com rutênio, o esporo apresenta uma estrutura fimbriosa (X) localizada no espaço intersticial do exósporo. A linhagem apresenta ainda uma série de estruturas similares à um *pilus* localizadas na porção externa do exósporo (Y). Contrastação por acetato de uranila e vermelho de rutênio.

5 - Termorresistência de esporos de linhagens SDFs

Os esporos das linhagens SDF foram testados quanto à termorresistência, outra característica fenotípica de valor taxonômico e fundamental para descrever potencial biotecnológico. Os resultados estão representados na tabela IV. Amostras de cultura em final de fase de esporulação foram submetidas a calor úmido em autoclave a 130 °C por 30 min; 9 °C e 15 min acima da faixa de esterilização padrão para esporos em autoclave de 121 °C por 15 min. Esporos das linhagens SDF0001; SDF 0011; SDF 0013; SDF 0021 e SDF 0049, depois de submetidos ao tratamento, apresentaram crescimento de colônias com aspectos similares ao crescimento em condições típicas. Após serem submetidos ao tratamento, esporos da linhagem SDF0047 apresentaram capacidade de germinar, porém com aumento expressivo no tempo padrão de crescimento. Esporos com morfologia sugestiva de *B. subtilis* (ultraestrutura consistindo em núcleo, córtex e capa; sem exósporo ou apêndices externos) corresponderam a uma das ultraestruturas típicas encontradas nos testes de termorresistência (SDFs 0001; 0011; 0013) enquanto a outra ultraestrutura típica consistiu em esporos com morfologia sugestiva de *B. megaterium* (SDFs 0021; 0049; 0047).

É importante ressaltar que a quantidade de linhagens que apresentaram termorresistência (30% ou 6/20) é consideravelmente alta. O objetivo desta análise foi verificar a capacidade de alguns esporos de linhagens SDF de manter viabilidade e serem capazes de retornar ao ciclo celular após serem submetidos a uma faixa de temperatura considerada atipicamente superior à considerada letal. Não foi feito controle quanto ao número de esporos que estavam sendo submetidos ao tratamento, portanto abordar questões de decaimento no número de esporos que se mantêm viáveis requer uma abordagem mais apropriada, com contagem da carga microbiana submetida ao tratamento térmico e comparação com a contagem de UFCs viáveis (esporos que germinaram) pós-tratamento.

Do nosso conhecimento, não há na literatura atual correlação de termorresistência/morfologia específica, sendo este outro dado importante que pode ser verificado por outras formas de abordagens. Em estudos futuros, outras condições podem ser exploradas para expandir o conhecimento gerado pelos dados relatados. Como exemplo, faixas mais elevadas de temperatura sob condições controladas de números de células submetidas ao tratamento e comparação com o número de indivíduos que germinaram após o tratamento.

Tabela IV. Termorresistência de esporos de linhagens SDFs analisadas neste estudo

Linhagem SDF	Resistência*
0001	+
0002	-
0005	-
0007	-
0008	-
0009	-
0011	+
0013	+
0015	-
0021	+
0024	-
0029	-
0030	-
0041	-
0042	-
0047	+
0048	-
0049	+
0051	-
FT9	-

em calor úmido (130 °C).

VI - Conclusão e perspectivas

Neste trabalho foram isoladas linhagens de Bafes de solo do DF e avaliada a diversidade de linhagens selecionadas da CBafes quanto a características fenotípicas básicas e identificação de biomoléculas — em especial as proteínas. Também foram analisadas características de ultraestrutura, composição proteica de capa e termorresistência de esporos. Este estudo, bem como os demais desenvolvidos pelo nosso grupo, representa um importante primeiro passo para identificação de características e propriedades físico-químicas, estruturais e taxonômicas das linhagens SDF que nos auxiliem, não somente a estabelecer uma caracterização apropriada, como também compreender e aperfeiçoar os demais estudos que seguirão.

A principal dificuldade encontrada durante a realização deste estudo foi a indisponibilidade de metodologias bem estabelecidas para análises de linhagens não modelo. Todas as abordagens realizadas neste trabalho tiveram caráter generalista para que o máximo de características fenotípicas pudesse ser rastreado, ainda que, de forma preliminar. Para otimizar os resultados aqui apresentados é necessário adequar as metodologias às diferenças, agora conhecidas, entre as linhagens SDF.

Os resultados obtidos, embora preliminares, reforçam a questão da diversidade presente nas linhagens da CBafes, não somente dentro de uma visão taxonômica, como também quanto ao potencial de exploração biotecnológica e abertura para várias linhas de pesquisa, incluindo a biofísica molecular estrutural das biomoléculas identificadas..

Estudos futuros de diversidade de Bafes do solo do DF podem ter como objetivo selecionar faixas de temperatura mais amenas, por exemplo 60 °C, como estratégia de seleção de linhagens. É possível ainda acrescentar maior variedade de meios de cultura contendo substratos não utilizados neste trabalho durante o isolamento, ampliando ainda mais a possibilidade de encontrar linhagens diferenciadas.

Este trabalho mostrou também que o gradiente de sacarose nessas amostras foi eficaz para purificação de proteínas das linhagens SDFs, algumas inclusive apresentando alto nível de pureza. Contudo, conforme mencionado, a heterogeneidade de algumas bandas requer a ampliação dessas faixas de concentração do gradiente.

A caracterização preliminar da ultraestrutura de esporos das linhagens SDFs revelou uma série de variações estruturais, cuja composição, mecanismos de montagem e funções não são, ainda, bem estabelecidas. A caracterização celular e molecular aprofundada da ultraestrutura de organismos não modelo corrobora a compreensão e elaboração dessas

definições, embora seja necessária a elaboração de metodologias para as espécies individualmente. Resultados da extração de proteínas de capa de esporo corroboram essa afirmação e, embora, os mesmos não tenham demonstrado alta eficiência, a presença de bandas isoladas de proteínas provenientes de esporos abre possibilidade para uma caracterização aprofundada das mesmas em abordagens adequadas.

A caracterização de termorresistência também é fundamental não só para fins taxonômicos, como também, para a exploração do potencial biotecnológico. Uma futura expansão dos resultados apresentados favorece esses interesses.

Esses resultados de diversidade são corroborados por dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa utilizando outros princípios, tais como, filogenia por genes de rRNA 16S e filoproteômica, por espectrometria de massa MALDI-TOF, o que demonstra o potencial da associação desses métodos para classificação das linhagens SDFs. Entretanto existe, ainda, a necessidade de aperfeiçoar a metodologia, para isso serão realizadas novas buscas por técnicas eficientes e de baixo custo para cobrir todas as linhagens da coleção.

Futuramente as análises realizadas neste trabalho poderão ser estendidas a todas as linhagens da CBafes, atualmente em expansão do acervo, e poderão ser refinadas pela adaptação das metodologias à abordagem proposta.

VII - Referências bibliográficas

- Abd El-Rahman, H.A., D. Fritze, C. Spröer and D. Claus. 2002. **Two novel psychrotolerant species, *Bacillus psychrotolerans* sp. nov. and *Bacillus psychrodurans* sp. nov., which contain ornithine in their cell walls.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 2127–2133.
- Achtman, M., Wagner, M. 2008. **Microbial diversity and the genetic nature of microbial species.** Nat. Rev. Microbiol. 6, 431–440.
- Agaisse, H., Lereclus, D. 1995. **How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?** J. Bacteriol. 177, 6027–6032.
- Ahmed, Yokota, A., Yamazoe, A., and Fujiwara T. 2007. **Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov.sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus*** Int Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
- Aizawa, S. I., Zhulin, I. B., Marquez-Magana, L. M. & Ordal, G. W.,2002. **Chemotaxis and motility. In *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives: from Genes to Cells**, pp. 437–452. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Andrup L, Barfod KK, Jensen GB, Smidt L.,2008. **Detection of large plasmids from the *Bacillus cereus* group.** Plasmid 59:139–143
- Aronson, A., and Fitz-James, P., 1976.**Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat.** Bacteriol Rev 40,360–402.
- Aronson, A., and Pandey N. K., 1978. **Comparative structural and functional aspects of spore coats**, p.54–61. In G. Chambliss and J.C. Vary (ed.), Spores—VII. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Aronson, A., 2002.**Sporulation and d-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*.** Cell. Mol. Life Sci. 59, 417–425.
- Barloy, F, Lecadet, M.M. and Delécluse, A. 1998. **Distribution of clostridial cry-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains.** Curr Microbiol. 36 (4):232 -7.
- Beall, B., Driks, A., Losick, R. and Moran, C. P. Jr., 1993. **Cloning and characterization of a gene required for assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat.** J. Bacteriol. 175, 1705–1716.
- Beaman, T.C., Pankratz H.S., and Gerhardt P.,1972.**Ultrastructure of the exosporium and underlying inclusions in spores of *Bacillus megaterium* strains.** J. Bacteriol. 109:1198–1209.
- Bender, G.R. and Marquis, R.E., 1985. **Spore heat resistance and specific mineralization.** Appl Environ Microbiol 50, 1415–1421.
- Brillard, J. e Lereclus, D. 2004. **Comparison of cytotoxin *cytK* promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain.** Microbiology-Sgm 150, 2699-2705.
- Burton, B.M., Marquis, K.A., Sullivan, N.L., Rapoport, T.A., and Rudner, D.Z., 2007. **The ATPase SpoIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*.** Cell 131, 1301–1312.
- Cano, R.J., Borucki, M.K., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H.N., Poinar, G.O., Jr and Pollard, K. J. 1994. ***Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis?** Appl. Environ. Microbiol. 60: 2164–2167.
- Cano, R.J., Borucki, M.K. 1995. **Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber.** Science, 268(5213):1060-4.
- Carrera, M., Zandomeni, R.O., Fitzgibbon J., and Sagripanti J.-L., 2006. **Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species.** Research & Technology

- Directorate, Edgewood Chemical Biological Center, US Army, MD, USA Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-507.
- Cheek, J. and Broderick, J.B., 2002. **Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate.** J Am Chem Soc 124, 2860–2861.
- Chen, G., Driks, A., Tawfiq, K., Mallozzi, M., and Patil, S., 2010. ***Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* spore surface properties and transport.** Colloids Surf. B Biointerfaces 76, 512–518.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. **The Genus *Bacillus*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** in: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Eds.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 1105.
- Cohan, F.M., 2002. **What are bacterial species?** Annu. Rev. Microbiol. 56, 457–487.
- Cohn, F., 1876. **Studies on the biology of the Bacilli.** Beitr. Biol. Pflanz 2, 249–276
- Cowan A.E., Koppel D.E., Setlow B., Setlow P., 2003. **A cytoplasmic protein is immobile in the cytoplasm of dormant spores of *Bacillus subtilis*: implications for spore dormancy.** Proc Natl Acad Sci USA, 100:4209-4214.
- Cowan, A.E., Koppel, D.E., Setlow, B. and Setlow, P., 2003. **A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy.** Proc Natl Acad Sci U S A 100, 4209–4214.
- Cowan, A.E., Olivastro, E.M., Koppel, D.E., Loshon, C.A., Setlow, B. and Setlow, P., 2004. **Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are immobile.** Proc Natl Acad Sci U S A 101, 7733–7738.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H. 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 807–813.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, D.H., 2008. ***B. thuringiensis* toxin nomenclature**, 1092-2172, p. 1–20 Vol. 63, No. 1.
- Cutting, S. 2006. **Bacterial spore formers as probiotics.** Feed Mix 14(6):22–23.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H. and Ginsberg, 1990. **Bacterial architecture.** In **Microbiology**, Eds., p. 47. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E., 2003. **Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** Annu. Rev. Genet. 37, 409–433.
- de Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B. (Eds.). 2009. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes.** Second Ed.
- de Vos, P. 2011. **Studying the Bacterial Diversity of the Soil by Culture-independent approaches.** Endospore forming soil bacteria. Vol 27 1-7
- Deutscher, J., A. Galinier and I. Martin-Verstraete. 2002. **Carbohydrate uptake and metabolism.** In ***Bacillus subtilis* and its Closest Relatives.** ASM Press, Washington, D.C., pp. 129–150.
- Douki, T., Setlow, B. and Setlow, P., 2005. **Effects of the binding of a/b-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and in vitro.** Photochem Photobiol 81, 163–169.
- Driks, A., Roels, S., Beall, B., Moran, C. P. and Losick, R., 1994. **Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*.** Genes & Dev. 8:234-244.
- Driks, A., 1999. **The *Bacillus subtilis* spore coat.** Microbiol Mol Biol Rev 63, 1–20.

- Driks, A., 2002. **Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat.** TRENDS in Microbiology Vol.10 No.6
- Driks, A., 2003. **The dynamic spore coat.** Proc Natl Acad Sci USA 100(6):3007–3009.
- Driks, A., 2007. **Surface appendages of bacterial spores.** Molecular Microbiology 63(3), 623–625.
- Ehling-Schulz, M.; Messelhäusser, U. 2013. ***Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling.** Frontiers in Microbiology, 4: 1-8.
- Eijlander, R.T.; de Jong, A.; Krawczyk, A.O.; Holsappel, S.; Kuipers, O.P. 2014. **SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*.** Nucleic Acid Research, 42: 685-691.
- Entwistle, P.F., Corey, J.S., Bayley, M.T., and Higgs, S., 1993. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice.** John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G. 1996. **Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5389–5394.
- Fagerlund, A., Ween, A., Lund, T., Hardy, S.P. and Granum, P.E., 2004. **Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*.** *Microbiology-Sgm*, 2689-2697.
- Fajardo-Cavazos P, Schuerger AC, Nicholson WL. 2008. **Persistence of biomarker ATP and ATP-generating capability in bacterial cells and spores contaminating spacecraft materials under Earth conditions and in a simulated Martian environment.** Appl. Environ. Microbiol. 74:5159–5167.
- Flügge, C. 1886. ***Die Mikroorganismen.*** Leipzig: Vogel.
- Foster, S.J., and D.L. Popham. 2002. **Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules.** In *Bacillus subtilis and its close relatives: from genes to cells.* American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.21-41.
- Frenkiel-Krispin, D., Englander, J., Shimoni, E., Eisenstein, M., Bullitt, E., Horowitz-Scherer, R., Hayes, C.S., Setlow, P. et al., 2004. **Structure of DNA-SspC complex: implications for DNA packaging, protection and repair in bacterial spores.** J Bacteriol 186, 3525–3530.
- Fritze, D. 2004. **Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria.** Phytopathology, 94(11). 1245-1248.
- Galperin, M.Y. 2013. **Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*.** Microbiology Spectrum, 1(2): 1-15.
- Garcia, D., van der Voort, M., Abee, T., 2010. **Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures.** International Journal of Food Microbiology 140 146–153.
- Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Lilburn, T.G. 2003. **Taxonomic outline of the prokaryotes.** In: Bergey’s manual of systematic bacteriology.
- Gerhardt, P. and Marquis, R.E., 1989. **Spore thermoresistance mechanisms.** In **Regulation of Prokaryotic Development** ed. Smith, I., Slepecky, R.A. and Setlow, P. pp. 43–63. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Gibbons, N.E., and Murray, R.G.E., 1978. **Proposals concerning the higher taxa of bacteria.** Int J Syst Bacteriol 28:1-6
- Giorno, R., Bozue, J., Cote, C., Wenzel, T., Sulayman, M., Krishna, M., Michael, R.M., Wang, R., Zielke, R.R., Maddock, J., Friedlander, A., Welkos, S., and Driks, A. 2007. **Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* Spore.** Journal of bacteriology, p. 691–705 Vol. 189, No. 30021-9193.

- Gonzalez-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., and Losick, R., 2003. **Cannibalism by sporulating bacteria**. *Science* 301, 510–513.
- Gould G.W., 1969. **Germination**. In **The Bacterial Spore**. Edited by Gould GW, Hurst A. New York: Academic Press; 1969: 397-444.
- Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Labruyere E, Mock M.,1999. **Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophage**. *Mol Microbiol* 31:9-17.
- Guinebrétière, M.H., and Sanchis, V., 2003. ***Bacillus cereus sensu lato***. *Bull Soc Fr Microbiol* 18:95-103.
- Guinebrétière, M.H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., Benoit, D.S., De Buysier, M.L., Lamberet. G., Fagerlund. A., Granum. E., Lereclus. D., De Vos. P., Nguyen 2012. **The *Bacillus cytotoxicus* sp. novis a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning**. *IJSEM*. Published February 17.
- Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz. 2002. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15-32.
- Harwood, C.R. 1989. ***Bacillus***. Plenon Press, New York.
- Harwood, C.R., 1992. ***Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses**. *Trends Biotechnol.* 10:247–256).
- Hayes, C.S. and Setlow, P., 2001. **An a/b-type small, acid-soluble spore protein which has a very high affinity for DNA prevents outgrowth of *Bacillus subtilis* spores**. *J Bacteriol* 183, 3982–3990.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolsto, A.B., 2004. **Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group**. *Appl Environ Microbiol* 70: 191-201.
- Henriques, A.O. and Moran, C.P.Jr. 2000. **Structure and assembly of the bacterial endospore coat**. *Methods* 20, 95-110.
- Henriques, A.O., and Moran, C.P.Jr., 2007. **Structure, assembly, and function of the spore surface layers**. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 555–588. 16.
- Hill, K.K., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Asay, M., Blair, H. and Bliss, K.A., 2004. **Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates**. *Appl Environ Microbiol* 70: 1068–1080.
- Hiragi, Y. 1972. **Physical, chemical and morphological studies of spore coat of *Bacillus subtilis***. *J. Gen. Microbiol.* 72:87–99.
- Höfte, H., and H. R. Whiteley, 1989. **Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis***. *Microbiol. Rev.* 53:242–255,
- Holt, J.G., 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: gram-positive bacteria other than actinomycetes**. Williams & Williams, Baltimore, MD.
- Holt, S.C. and Leadbetter, E.R., 1969. **Comparative ultrastructure of selected aerobic spore-forming bacteria: a freeze-etching study**. *Bacteriol Rev* 33, 346–378.
- Holt, S. C., J. J. Gauthier, and D. J. Tipper. 1975. **Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus***. *J. Bacteriol.* 122:1322–1338.
- Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. **The use of bacterial spore formers as probiotics**. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 813e835.
- Hoon M. J.L., Eichenberger P., and Vitkup D., 2010 **Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network**. *Current Biology* 20, R735–R745
- Horikoshi, K. 1996. **Alkalophiles: from an industrial point of view**. *FEMS Microbiol.* 18, 259-270.
- Houry A., Briandet R., Aymerich S. and Gohar M., 2010. **Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation**. *Microbiology*, 156, 1009–1018.

- Hudson K.D., Corfe B.M., Kemp E.H., Feavers I.M., Coote P.J., Moir A., 2001. **Localization of GerAA and GerAC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore.** J Bacteriol, 183:4317-4322.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. and Martin-Verstraete, I. 2001. **CotA of *Bacillus subtilis* is a copper dependent laccase.** J. Bacteriol. 183, 5426–5430.
- Huynh, A., Hon, Le Hong Duc, Simon M. Cutting, 2005. **The use of bacterial spores as probiotics.** FEMS microbiology reviews 29 813-835.
- Ibarra, J.E, del Rinéon M.C, Ordúz S., Noriega D., Benintende G, Monnerat R., Regis L., de Oliveira C.M.F, Lanz H., Rodriguez M.H., Sanchez J., pena G. e Bravo A., 2003. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species.** Appl. Environ. Microbiol. 69; 5269-5274.
- Ito, S., Wakamatsu, K., and Ozeki, H., 2000. **Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis.** Pigment Cell Res. 13, 103–109, 2000.
- Jacobson, E.S., 2000. **Pathogenic roles for fungal melanins.** Clin. Microbiol. Rev. 13, 708.
- Jedrzejewski MJ, Setlow P., 2001. **Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis by a phosphoserine intermediate.** Chem Rev, 101:607-618
- Jones, C.A., Padula, N.L., Setlow, P.J., 2005. **Effect of mechanical abrasion on the viability, disruption and germination of spores of *Bacillus subtilis*.** Appl. Microbiol. 99 1484–1494.
- Joo, H.S., C.G. Kumar, C.G. Park, K.T. Kim, S.R. Paik, and C.S. Chang., 2002. **Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshi*.** Process Biochem. 38, 155-159.
- Katz, E. and A.L. Demain. 1977. **The peptide antibiotics of *Bacillus* : chemistry, biogenesis and possible functions.** Bacteriol, Rev 41:449-474.
- Kembhavi, A.A., A. Kulkarni, and A. Pant, 1993. **Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis*** NCIM No. 64. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38, 83-92.
- Kim, K.K., Lee K.C., YuH., Ryoo S., Park Y. and LeeJ.S., 2009. ***Paenibacillus sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary disease.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 60, part 10, pp. 2371 - 2376
- King, J. 1980. **Regulation of structural protein interactions as revealed in phage morphogenesis regulation and development.** vol. 2. Plenum Press, New York, N.Y.
- Knaysi, G. and Hillier, J., 1949. **Preliminary observations on the germination of the endospore in *Bacillus megatherium* and the structure of the spore coat.** J Bacteriol 57, 23–29.
- Koch, R., 1876. **The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*.** Beitr. Biol. Pflanz 2, 277–310
- Koeppel A., Perry E.B., Sikorski J., Krizanc D., Warner A., Ward D.M., Rooney A.P., Brambilla E., Connor N., Ratcliff R.M., Nevo E., Cohan F.M., 2008. **Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics.** Proc Natl Acad Sci USA 105:2504–2509
- Kotob, S.I., Coon, S.L., Quintero, E.J., Weiner, R.M. 1995. **Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*.** Appl. Environ. Microbiol. 61 : 1620–1622.
- Kroos, L., 2007. **The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators.** Annu. Rev. Genet. 41, 13–39.
- La Duc, M.; Satomi, M.; Venkateswaran, K. 2004. ***Bacillus odysseyi* sp. nov., a round-spore-forming bacillus isolated from the Mars Odyssey spacecraft.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 195-201.

- Lai E.M., Phadke N.D., Kachman M.T., Giorno R., Vazquez S., Vazquez J.A., Maddock J.R., Driks A., 2003. **Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis***. *J Bacteriol.* Feb;185(4):1443-54.
- Lakowicz J.R., 2007. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Third ed. Springer.
- Lechner, S., Ralf Mayr, K.P., Francis, B.M., Thomas, K., Elke, W.G., Gordon, S., Stewart A.B., and Siegfried S. 1998. ***Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group** *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1373-1 382.
- Lereclus, D., Lecadet, M. M., Ribier, J. and Dedonder, R., 1982. **Molecular relationships among plasmids of *B. thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains**. *Mol. Gen. Genet*, 186, 391–398.
- Logan N.A., Carman A., Melling J. and Berkele C.W., 1985. **Identification of *Bacillus anthracis* by api tests**. *med microbiol.*-vol. 20: 75-85,
- Logan N.A., Lebbe L., Hoste B., Goris J., Forsyth G., Heyndrickx M., Murray B.L., Syme N., Wynn-Williams D.D., De Vos P. 2000. **Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol.* Sep;50 Pt 5:1741-53.
- Logan N.A., Berge O., Bishop A.H., Busse H.J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., K€ampfer P., Salkinoja-Salonen M.S., Seldin L., Rabinovitch L., Ventosa A., 2009. **Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria**. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2114–2121
- Logan, N.A. and De Vos, P. 2009. **Genus I. *Bacillus* Cohn 1872**, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 174AL. Vol3. *The firmicutes* 2nd Edition.
- Londono-Vallejo, J. A., C. Frehel, and P. Stragier. 1997. **spoIIQ, a fore- spore-expressed gene required for engulfment in *Bacillus subtilis***. *Mol. Microbiol.* 24:29–39.
- Losick R., Youngman P., Piggot P.J., 1986. **Genetics of endosporeformation in *Bacillus subtilis***. *Annu Rev Genet* 20:625–669.
- Losick, R., and P. Stragier. 1992. **Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *Bacillus subtilis***. *Nature* 355:601– 604.
- Losick, R., and Stragier, P., 1999. **Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis***. *Nature* 355, 601–604.
- Lund, T., De Buyser, M. L. & Granum, P. E., 2000. **A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis**. *Molecular Microbiology* 38, 254-261.
- Mandic-Mulec I., Prosser J.I.; 2011. **Diversity of Endospore forming Bacteria in soil: characterization and driving mechanisms**. *Endospore forming soil bacteria*. Vol 27 31-57
- Margolis, P., A. Driks, and R. Losick. 1991. **Establishment of cell type by compartmentalized activation of a transcription factor**. *Science* 254:562– 565.
- Margulis, L., Jorgensen J. Z., Dolan S., Kolchinsky R., Rainey F. A., and. Lo S, 1998. **The *Arthromitus* stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals** *Biological Sciences – Microbiology PNAS* 95(3) 1236-1241.
- Maughan, H., Auwera, G.V. 2011. ***Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading** *Infection, Genetics and Evolution* 11:789–797.
- McKenney P.T., Driks A., Eichenberger P. ,2013. **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat**. *Nat Rev Microbiol.* 33-44. December.
- Meador-Parton, J. and Popham, D. 2000. **Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation**. *J Bacteriol* 182, 4491–4499.

- Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A. and Setlow, P., 2002. **Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures.** J Appl Microbiol 92, 1105–1115.
- Miller M.B. and Bassler B.L..2001. **Quorum sensing in bacteria.** Annu Rev Microbiol.;55:165-99.
- Mitchell, C., Iyer, S., Skomurski, J.F. and Vary, J.C. 1986. **Red pigment in *Bacillus megaterium* spores.** Appl. Environ. Microbiol., 52(1):64.
- Mizuki, E., M. Ohba, T. Ichimatsu, S.-H. Hwang, K. Higuchi, H. Saitoh, and T. Akao. 1998. **Unique appendages associated with spores of *Bacillus cereus* isolates.** J. Basic Microbiol. 38:33–39.
- Moberly, B.J., Shafa, F. and Gerhardt, P., 1966. **Structural details of anthrax spores during stages of transformation into vegetative cells.** J Bacteriol 92, 220–228.
- Mock M., Fouet A., 2001.**Anthrax.** Annu Rev Microbiol.;55:647-71.
- Moir A. Corfe B.M., Behravan J. 2002. **Spore germination.** Cell Mol Life Sci, 59:403-409.
- Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z., 2010. **A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*.** Genes Dev. 24, 411–422.
- Murrell, W.G., 1969. **Chemical composition of spores and spore structures in, the bacterial spore.** p. 215–273 Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Nakamura, L.K. and Jackson, M.A., 1995. **Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*.** Int J Syst Bacteriol 45, 46-49,
- Nakamura, L.K, 1998. ***Bacillus pseudomycoides* sp. nov.** international Journal of Systematic Bacteriology.48, 103 1-1 035.
- Nakano, M.M., and P. Zuber. 1990. **Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*.** Crit. Rev. Biotechnol. 10:223-240.
- Ng, T.K. and W.F. Kenealy, 1986 .**Industrial application of thermostable enzymes,** pp. 197-205. In T.D. Brock (ed.), Thermophiles General Molecular and Applied Microbiology.
- Niall, A.L.,and Halket, G., 2011. **Developments in the taxonomy of aerobic, endospore forming Bacteria. Endospore forming soil bacteria.** Vol 27 1-7
- Nicholson W. & Setlow P., 1990. **Molecular Biological Methods for Bacillus,** eds. C. Harwood & S. Cutting, New York: John Wiley, pp.391-450.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. and Setlow, P. 2000. **Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.** Microbiol Mol Biol Rev 64, 548–572.
- Nicholson, W.L., Schuerger, A.C. and Setlow, P., 2005. **The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight.** Mutat Res 571, 249–264.
- Oberoi, R., Q.K. Beg, S. Puri, R.K. Saxena, and R. Gupta, 2001.**Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp.** World J. Microbiol. Biotechnol. 17, 493-497.
- Ohba M, Wasano N and Mizuki E., 2000. ***Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan.** Microbiol Res 155: 17-22.
- Ohba M, Mizuki E, and Uemori, A., 2009. **Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*.** Anticancer Research, 29: 427-434,
- Okinaka, R., Pearson, T., Keim, P., 2006. **Anthrax, but not *Bacillus anthracis*?** PLoS Pathog. 2,e122.
- Oliveira, J.V.A., Raiol, T., Farias, N.C., Almeida, N.F., Telles, G.P., Setubal J.C., Torres, F.A, Demarco, J., Brigido, M.M., Walter, M.E.M.T., De-Souza, M.T., and Pepe, L.M., 2013. **Genome sequence of a novel *Bacillus* strain of the *B. cereus* group isolated from**

- a thermal spring.**The International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* & *B. thuringiensis* (Bact2013) Victoria - Canada, 01-06 de agosto.
- Ozin, A.J., Henriques, A.O., Yi, H., and Moran, C.P., Jr., 2000. **Morphogenetic proteins SpoVID and SafA form a complex during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat.** J. Bacteriol. 182, 1828–1833.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A. and Setlow, P., 2000. **Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid.** J Bacteriol 182, 5505–5512.
- Paidhungat M, Setlow P., 2002. **Spore germination and outgrowth. In *Bacillus subtilis* and its Relatives: From Genes to Cells.** Edited by Hoch JA, Losick R, Sonenshein AL. Washington, DC: American Society for Microbiology: 537-548.
- Panessa-Warren, B., Tortora, G., Wong, S.S., Ghebrehiwet, B. & Warren, J. 2003. ***Bacillus* and *Clostridium* spore attachment/ entry of human colon cells.** *Microsc Microanal* 9Suppl. 2, 1378–1379.
- Park S.J., Yoon J.C., Shin K.S., Kim E.H., Yim S., Cho Y.J., Sung G.M., Lee D.G., Kim S.B., Lee D.U., Woo S.H., Koopman B. 2007. **Dominance of endospore- forming bacteria on a rotating activated *Bacillus* contactor biofilm for advanced wastewater treatment.** J Microbiol 45:113–121.
- Perez-Fons, L. , Sabine Steiger , R. K. , Peter M.B. , Cutting S.M., G.S., Fraser P.D.2011. **Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1811.
- Pettersson, B., F. Lembke, P. Hammer, E. Stackebrandt and F.G. Priest. 1996. ***Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat- resistant endospores.** Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 759–764.
- Piggot, P.J., and Coote, J.G., 1976. **Genetic aspects of bacterial endospore formation.** Bacteriol. Rev. 40, 908–962.
- Piggot, P.J., and Losick, R., 2002. **Sporulation genes and intercompartmental regulation. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 483–518.**
- Pignatelli, M., Moya, A., Tamames, J., 2009. **EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa.** *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 191– 197.
- Plonka, P.M., Grabacka, M., 2006. **Melanin synthesis in microorganisms biotechnological and medical aspects** 429 – 443. In *Acta Biochim Pol.*
- Popham, D. L., J. Helin, C. E. Costello, and P. Setlow., 1996. **Analysis of the peptidoglycan structure of *Bacillus subtilis* endospores.** J. Bacteriol. 178:6451-6458.
- Popham, D.L., 2002. **Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox.** *Cell Mol. Life Sci.* 59, 426–433.
- Powell, K.A 1993. **The commercial exploitation of microorganism in agriculture,** p. 441– 459. In: *Exploitation of microorganisms* (D. G. Jones. ed.). Chapman and Hall, London, England.
- Priest F. G., 1993. **Systematics and ecology of *Bacillus*.** In: *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular genetics. American Society for Microbiology. pp. 3–16.
- Priest, F. G., 2002. ***Bacillus sphaericus* and its insecticidal toxins.** In: *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives* Blackwell Publishing. (pp. 190-205).
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W.J., Holmes, E.C., and Maiden, M.C.J., 2004. **Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group.** J Bacteriol 186: 7959–7970.
- Prota, G. 1992. **Melanins and Melagenesis.** Academic, San Diego.

- Ptacin, J.L., Nollmann, M., Becker, E.C., Cozzarelli, N.R., Pogliano, K., and Bustamante, C., 2008. **Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis***. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 485–493.
- Ramamurthi, K.S., Lecuyer, S., Stone, H.A., and Losick, R., 2009. **Geometric cue for protein localization in a bacterium**. *Science* 323, 1354–1357.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597–635.
- Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J , 2005. **Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms**. *FEMS Microbiol Rev* 29:303–329
- Raymond B., Johnston P.R., Nielsen L.C., Lereclus D. and Crickmore N., 2010. ***Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?**, Cell press.Elsevier Ltd.0966-842X, 2010.
- Rebeil, R. and Nicholson, W.L., 2001. **The subunit structure and catalytic mechanism of the *Bacillus subtilis* repair enzyme spore photoproduct lyase**. *Proc Natl Acad Sci USA*98, 9038–9043.
- Redmond, C., Baillie, L.W., Hibbs, S., Moir, A.J. and Moir, A., 2004. **Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis***. *Microbiology* 150, 355–363.
- Riesenman P.J., Nicholson W.L., 2000. **Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation**. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:620–626.
- Ruan. L., Ziniu Y., Bin F., Wei H., Yujie W., and Ping S. , 2004. **Melanin Pigment Formation and Increased UV Resistance in *Bacillus thuringiensis* Following High Temperature induction**. *System. Appl. Microbiol.* 27, 286–289.
- Russell, A., 1990.**Bacterial spores and chemical sporocidal agents**. *Clin Microbiol Rev* 3, 99–119.
- Russell, B.H., Vasani, R., Keene, D.R., Xu, Y.2007. **Potential dissemination of *Bacillus anthracis* utilizing human lung epithelial cells**. *Cell Microbiol.* 9 1262–1274.
- Russell, B.H., Vasani, R., Keene, D.R., and Xu, Y.,2007. ***Bacillus anthracis* internalization by human fibroblasts and epithelial cells**. *Cell Microbiol* 9: 1262–1274.
- Saile E., Koehler T.M., 2006 ***Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants**. *Appl Environ Microbiol* 72:3168–3174
- Salas J.A., Johnstone K., Ellar D.J., 1985. **Role of uricase in the triggering of germination of *Bacillus fastidiosus* spores**. *Biochem J* 229(1):241–249.
- Sanchez-Salas, J.-L., Santiago-Lara, M.L., Setlow, B., Sussman, M.D. and Setlow, P., 1992. **Properties of mutants of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* which lack the protease that degrades small, acid-soluble proteins during spore germination**. *J Bacteriol* 174, 807–814.
- Santana, M.A., Moccia-V, C.C., Gillis, A.E., 2008.***Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples**. *Journal of Microbiological Methods* 75:357–358.
- Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z., Boussiba, S. and Zaritsky, A., 2002.**A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki producing melanin**. *Curr. Microbiol.* 44, 25–30.
- Schaeffer A.B., Fulton M., 1993.**A simplified method of staining endospores**. *Science* 77, 194.
- Schafner, P., 1996.**Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and endotoxins**. *Bacteriol. Rev.* 33:48-71.
- Schleifer, Karl-Heinz . **Phylum XIII. Firmicutes** Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmicutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol3. *The firmicutes* 2nd Edition 2009

- Schmidt, R., P. Margolis, L. Duncan, R. Coppolecchia, C. P. Moran, Jr., and R. Losick. 1990. **Control of developmental transcription factor sF by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9221–9225.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C. and Setlow, P., 2002. **Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol**. J Appl Microbiol 92, 362–375.
- Setlow, P. 1995. **Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species**. Ann Rev Microbiol 49, 29–54.
- Setlow, P., 2000. **Resistance of bacterial spores**. In **Bacterial Stress Responses** ed. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. pp. 217–230. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Setlow P., 2003. **Spore germination**. Curr Opin Microbiol 6:550–556.
- Setlow P. 2006. **Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals**. J Appl Microbiol 101(3):514–525.
- Shivaprasad, S. and Page, W.J., 1989. **Catechol formation and melanization by Na⁺-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation**. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1811–1817.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. and Clark, F.E., 1952. **Aerobic spore forming bacteria**. U.S. Department of Agriculture Agricultural Monolog. 16. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- Smith NR, Kishchuk BE, Mohn W.W., 2008. **Effects of wildfire and harvest disturbances on forest soil bacterial communities**. Appl Environ Microbiol 74:216–224
- Sommerville, H.J. and Jones, M.L., 1972. **DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group**. J Gen Microbiol 73.
- Sousa, J. C., M. T. Silva, and G. Balassa. 1978. **Ultrastructure and development of an exosporium-like outer spore envelope in *Bacillus subtilis***. Ann. Microbiol. 129:339–362.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E and Trüper, H.G., 1988. ***Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives**. *Int. J. Syst. Bacteriol*38, 321-325.
- Staley J.T., 2006. **The bacterial species dilemma and the genomic phylogenetic species concept**. Phil. Trans. R. Soc. B.
- Stragier, P., 1992. **Establishment of forespore-specific gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*, procaryotic structure and function**. Society for General Microbiology, p. 297–310., London, United Kingdom.
- Stragier, P., 2002. **A gene odyssey: Exploring the genomes of endospore-forming bacteria**. In ***Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells**, A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick, eds. (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 519–526.
- Suel, G.M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L.M., and Elowitz, M.B., 2006. **An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation**. Nature 440, 545–550.
- Takamatsu, H., Kodama, T., Nakayama, T., and Watabe, K., 1999. **Characterization of the *yrbA* gene of *Bacillus subtilis*, involved in resistance and germination of spores**. J. Bacteriol. 181, 4986–4994.
- Teleman, A.A., Graumann, P.L., Lin, D.C., Grossman, A.D., and Losick, R., 1998. **Chromosome arrangement within a bacterium**. Curr. Biol. 8, 1102–1109.
- Thomas D.J., Morgan J.A., Whipps J.M., Saunders J.R., 2001. **Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae**. Appl Environ Microbiol 67:330–338

- Thompson B.M., Hoelscher B.C., Driks A., Stewart G.C., 2012. **Assembly of the BclB glycoprotein into the exosporium and evidence for its role in the formation of the exosporium 'cap' structure in *Bacillus anthracis***. *Mol Microbiol*;86(5):1073-84.
- Todd, S.J., Moir, A.J., Johnson, M.J. and Moir, A., 2003. **Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium**. *J Bacteriol* 185, 3373–3378.
- Traag B.A., Driks, A., Stragier, P., Bitter W., Broussard, G., Hatfull, G., Chu, F., Adams, K.N., Losick, R., 2010. **Do *mycobacteria* produce endospores?** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 878-881.
- Van der Auwera, G., Timmerly, S., Hoton, F., Mahillon, J. 2007. **Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs**. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 164-172.
- Vary, P.S., 1994. **Prime time for *Bacillus megaterium***. *Microbiology* 140 (Part 5): 1001–1013.
- Vary, S.P., Biedendieck R., Fuerch T., Meinhardt, F., Rohde M., Deckwer W., and Jahn D. 2007. ***Bacillus megaterium*— from simple soil bacterium to industrial protein production** host. *Appl Microbial Biotechnol* 76:957–967.
- Veening, J.W., Murray, H., and Errington, J., 2009. **A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis***. *Genes Dev.* 23, 1959–1970.
- Veening, J.W., Smits, W.K., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P., 2006. **Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media**. *J. Appl. Microbiol.* 101, 531–541.
- Verbaendert, I.; de Vos, P. 2011. **Studying Denitrification by Aerobic Endospore-forming Bacteria in Soil**. Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria**. Springer, 1^a Ed.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., Powers, D.W. 2000. **Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal**. *Nature*, 407(6806):897-900.
- Walker, J.R., Gnanam, A.J., Blinkova, A.L., Hermanson, M.J., Karymov, M.A. and Lyubchenko, Y.L., 2007. ***Clostridium taeniosporum* spore ribbon-like appendage structure, composition and genes**. *Mol Microbiol* doi:10.1111.
- Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A. and Price, R.L., 2004. **Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis***. *J Microbiol Methods* 58, 23–30.
- Warth, A.D., Ohye, D.F., and Murrell, W.G., 1963. **The composition and structure of bacterial spores**. *J Cell Biol* 16: 579–592.
- Wenzel, M., Schonig, I., Berchtold, M., Kampfer, P., and König, H., 2002. **Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis***. *J Appl Microbiol* 92: 32–40.
- Whiteley, H.R., Schnepf, H.E., 1986. **The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis***. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 549–576.
- Wilcks A, Smidt L, Okstad OA, Kolsto AB and Mahillon J, 1999. **Replication mechanism and sequence analysis of the replicon of pAW63, a conjugative plasmid from *Bacillus thuringiensis***. *J Bacteriol.*181:3193–3200
- Winslow C., Broadhurst E.A, Buchanan R. E., Krumwiede, C.Jr., Rogers L. A., and Smith, G. H. 1920. **The families and genera of the Bacteria. Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types** *J Bacteriol.* May; 5(3): 191–229.
- World Health Organization. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: UNDP/World Bank/WHO 24p Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 1985.
- Young, S.B., and Setlow, P., 2004. **Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone**. *J Appl Microbiol* 96: 1133–1142.

- Zeigler, D.R., and Perkins, J.B., 2009. **The genus *Bacillus***. In: Goldman, E., Green, L.H. (Eds.), *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Zhang, B., A. Hofmeister, and L. Kroos. 1998. **The prosequence of pro- sigma K promotes membrane association and inhibits RNA polymerase core binding**. *J. Bacteriol.* 180:2434–2441.
- Zhang, J., H. Ichikawa, R. Halberg, L. Kroos, and A. I. Aronson. 1994. **Regulation of the transcription of a cluster of *Bacillus subtilis* spore coat genes**. *J. Mol. Biol.* 240:405–415.
- Zhang, J, Schairer, HU, Schnetter, W, Lereclus, D, and Agaisse, H., 1998. ***Bacillus popilliaecry18Aa* operon is transcribed by sigma E and sigma K forms of RNA polymerase from a single initiation site**. *Nucleic Acids Research*, 26(5):1288–1293
- Zhang, M. Y., Lovgren, A. and Landen, R., 1995. **Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* to cultured Spodoptera and Drosophila cells**. *J Invertebr Pathol* 66, 46–51.
- Zheng, L.B., Donovan, W.P., Fitz-James, P.C., and Losick, R., 1988. **Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore**. *Genes Dev.* 2, 1047–1054.