



***Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica¹**

Kessia Caroline Souza Alves², Maria Edilene Martins de Almeida³, Juliane Correa Glória⁴, Felipe Araújo dos Santos⁵, Keila Dayane Pereira⁶, Diogo Pereira de Castro⁷
Luis André Morais Mariúba⁸

Resumo

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (generally regarded as safe) pelo FDA Americano, sendo amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Quando exposta à um meio que apresenta deficiência de nutrientes o *B. subtilis* produz um tipo de célula morfologicamente distinta, denominada de esporo. Os esporos de *B. subtilis*, apresentam propriedades de resistência, capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições extremas de estresse. Devido a sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal pois suporta alta temperatura, dessecação, ausência de nutrientes e exposição a solventes químicos, tais características, facilitam o armazenamento e o transporte dos mesmos. Além de ter um baixo custo poder ser reutilizado quando acoplado a moléculas. A pesquisa bibliográfica que auxiliou essa revisão foi baseada em artigos científicos publicados em banco de dados eletrônicos, PUBMED e Periódico Capes. Dentre as aplicações dos esporos de *B. subtilis*, destacam-se, a produção de enzimas industriais, produção de proteínas heterólogas, imobilização de moléculas, inseticidas, antibióticos, adjuvante vacinal, entre outras.

Palavras-chaves: *Bacillus subtilis*; esporos; vacina; biotecnologia

Bacillus subtilis: a versatile biotechnological tool. *Bacillus subtilis* is a non-pathogenic Gram-positive bacterium which has GRAS status (generally regarded as safe) by American Food and Drug Administration (FDA) and is worldwide used in production of extracellular enzymes. When exposed to a medium deficient in nutrients, *B. subtilis* produces a type of cell morphologically distinct, called spore. The spores of *B. subtilis* have resistance properties, capable of surviving for long periods of time under extreme stress conditions. Due to its stability and safety, the spore is an ideal biotechnological tool. It supports high temperature, desiccation, absence of nutrients and exposure to chemical solvents, such characteristics, facilitate its storage and transport. In addition, it has a low cost and can be reused when coupled to molecules. Bibliographic research which assisted this review was based on scientific articles deposited in online database, PUBMED and Capes Journal. Among the applications of *B. subtilis* spores,

¹ Parte da Revisão de Dissertação de Mestrado do primeiro autor em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil.

² Biotecnóloga, mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005. E-mail: kessiafenty@gmail.com.

³ Bióloga, Doutoranda em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC- ILMD), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴ Biotecnóloga, mestranda na Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

⁵ Biomédico, Apoio Técnico do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

⁶ Mestre em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM.

⁷ Doutor em Biotecnologia, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

⁸ Biotecnologista do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.



production of industrial enzymes, heterologous proteins, immobilization of molecules, insecticides, antibiotics, vaccine adjuvants, among others, are highlighted.

Key-words: *Bacillus subtilis*; spores; vaccine; biotechnology

1. Introdução

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva não patogênica, amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Esta bactéria recebeu o status GRAS (generally regarded as safe) pelo FDA Americano, é uma das mais estudadas, tendo seu genoma e características bem elucidadas. As culturas dessa bactéria foram muito populares mundialmente antes da introdução dos antibióticos, pois eram utilizadas como agentes imunoestimulantes para auxiliar em tratamentos do trato gastrointestinal em toda América e Europa a partir de 1946.

A aplicação desta bactéria com finalidades industriais datam mais de mil anos, uma vez que a produção de *natto* por fermentação no estado sólido da soja foi realizado pela primeira vez em 1982 no Japão (SCHALLMEY et al., 2004).

O *B. subtilis*, quando submetido a um ambiente escasso em nutrientes, produz uma célula morfológica distinta chamada esporo (WANG; WANG; YANG, 2017). Esses esporos possuem grande resistência, podendo sobreviver extremos de temperaturas (altas ou baixas), além de outras condições adversas. Ademais, *B. subtilis* tem um histórico de segurança incontestável, pois seus esporos são muito utilizados como probióticos para humanos e animais, em algumas regiões da Ásia e da África, na qual existe um grande consumo de alimentos à base de esporos (DE SOUZA, 2014).

Estudos tem destacado que esporos de *B. subtilis* podem atuar como adjuvantes vacinais, promovendo a elevação da resposta humoral sérica e de mucosa após a co-administração com antígenos tanto acoplados a superfície ou integrados na forma de esporos recombinantes (DE SOUZA et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Alguns antígenos foram testados com sucesso em esporos de *B. subtilis*, como os

antígenos de *Rotavírus* (LEE et al., 2010), *Helicobacter acinonychis* (HINC et al., 2010), *Escherichia coli* (GOMES et al., 2009; ISTICATO et al., 2013), *Bacillus anthracis* (DUC et al., 2007), Tuberculose (DAS et al., 2016), *Helicobacter pylori* (ZHOU et al., 2015), Tétano (MAURIELLO et al., 2004) entre outros, indicando este sistema como uma excelente metodologia de apresentação vacinal.

Devido a sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal com diversas aplicações potenciais. Esta revisão irá destacar a utilização dos esporos de *B. subtilis*; na imobilização de moléculas, adjuvantes vacinais e vacinação e alimentação animal.

2. Metodologia

A revisão da literatura sobre *Bacillus subtilis* e suas principais aplicações na área da saúde foi realizado por meio de busca de publicações de pesquisas sobre esporos de *Bacillus subtilis* e vacinas disponíveis em banco de dados eletrônicos, PUBMED e Periódico Capes. O período das publicações foi de 2001 a 2017, cujas palavras-chave foram: “*Bacillus subtilis*”, “Spore”, “Vaccine”, “Spore Display” e “Animal feed”.

3. Aplicações do esporo de *B. subtilis*.

Bacillus subtilis é amplamente utilizado na produção de enzimas extracelulares em escala mundial. Possui atividade industrial devido as várias razões tais como, sua alta taxa de crescimento em ciclos curtos, estabilidade, além de seu status GRAS (*generally regarded as safe*), uma vez que essa espécie é considerada segura e não patogênica para os humanos (SCHALLMEY et al., 2004).



Os esporos de *Bacillus subtilis*, estão envoltos por um revestimento protetor constituído por uma camada interior e uma externa, sendo composto por mais de 70 proteínas diferentes. Estas proteínas de revestimento, são sintetizadas dentro das células-mãe esporulantes, e são depositadas na superfície dos esporos a medida que os pré-esporos emergem (PAN et al., 2012). Desta maneira ocorre a formação de proteínas de fusão com proteínas de revestimento sendo um método fácil de exibição de proteínas (KIM & SCHUMANN, 2009).

Das proteínas de revestimento que são mais utilizadas para o método de exibição na superfície dos esporos, destacam-se as proteínas de revestimento denominadas de CotB e CotC, sendo as mais utilizadas para produção de proteínas heterólogas (DUC & CUTTING, 2003; ISTICATO et al., 2001).

O método de exibição dos esporos de *Bacillus subtilis*, podem ser obtidos de duas maneiras diferentes. O primeiro, envolve a recombinação da bactéria, realizada por meio da inserção de uma sequência de DNA de interesse no genoma desta, gerando esporos recombinantes sendo que estes apresentam diversas aplicações, como: adjuvantes vacinais, biocatalizadores probióticos para uso em humanos e animais, além de geração e seleção de bibliotecas de mutagênese. O Segundo método se caracteriza pela adsorção de antígenos e enzimas na superfície dos esporos. Tal abordagem não recombinante parece particularmente adequada para aplicações envolvendo a entrega de moléculas ativas para superfícies de mucosas em humanos ou animais (ISTICATO & RICCA, 2014; RICCA et al., 2014).

Vale ressaltar que os esporos de *B. subtilis*, possuem a vantagem de oferecer propriedades de resistência única, uma vez que são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições extremas de estresse, como alta temperatura, dessecação, ausência de nutrientes e exposição a solventes químicos, tais características, facilitam o armazenamento e

o transporte dos esporos (DE SOUZA et al., 2014).

3.1 Esporos para imobilização de Enzimas

O sistema de exibição de moléculas biologicamente ativas na superfície de microrganismos tem sido uma estratégia mais recorrida para várias aplicações biotecnológicas (WU et al., 2008). O esporo de *B. subtilis* vem sendo usado em vários estudos para a expressão superficial de diferentes proteínas alvo, sendo que para a exibição na superfície dos esporos dessas proteínas alvo, são usados vários motivos de ancoragem, como CotB, CotC, BclA, InhA, CotE e CotG (KIM & SCHUMANN, 2009).

A Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) é amplamente utilizada como componente de kits de diagnóstico para a detecção e purificação de IgG a partir de soro ou outros fluidos biológicos.

Em um estudo realizado por Ghaedmohammadi e colaboradores (2015) com a SpA purificada, adsorvida e ligada covalentemente aos esporos de *Bacillus subtilis*, foi observado que a SpA manteve a ligação a IgG após etapas consecutivas de ligação e lavagem, sugerindo que este pode ser reciclado e utilizado várias vezes. Além disso, a análise FACS indicou que os esporos ligados SpA de forma covalentemente melhoraram significativamente as intensidades de fluorescência quando comparados aos esporos com SpA adsorvido espontaneamente. Eles concluíram que em comparação com as matrizes de imobilização convencionais, os esporos apresentam mais vantagens, pelo fato de ter baixo custo, altas taxas de produção e facilidade de manuseio, desse modo o esporo imobilizado com a SpA apresenta potências para o desenvolvimento posterior de pesquisas imunológicas e bioquímicas.

Em outro estudo, a enzima tirosinase - monooxigenase de grande importância industrial, médicas e ambientais - de *Bacillus megaterium* foi imobilizado em esporos de *Bacillus subtilis*, utilizando a proteína CotE como proteína âncora. A expressão da enzima na superfície dos



esporos foi confirmada por meio de citometria de fluxo. Os resultados indicaram, que não houve diminuição significativa da atividade enzimática após ser utilizada por mais de três vezes. Além disso, esta manteve a estabilidade podendo ser armazenada a temperatura ambiente. (HOSSEINI-ABARI et al., 2016).

Um outro estudo, buscou estratégias para descontaminar ambientes onde foram utilizados pesticidas organofosforados, muito usado na agricultura.

Para realizar o processo de desintoxicação o método mais aplicado é com a enzima organofosforo hidrolase (OPH), porém uma abordagem ecológica, seria de suma importância para a produção dessa enzima de maneira a mantê-la estabilizada. Neste estudo, os esporos de *B. subtilis* foram aplicados como uma nova matriz para imobilizar OPH, esta enzima foi ligada covalentemente aos esporos usando EDC-NHS como reagentes de acoplamento e a imobilização foi confirmada por atividade enzimática, transferência de Western, citometria de fluxo e análise microscópica de fluorescência. Foi observado um aumento da estabilidade do pH e térmica da enzima OPH, protegendo do pH ácido e alcalino e de altas temperaturas.

Quando comparado com forma livre, o OPH imobilizado manteve a sua atividade enzimática a altas temperaturas e pH alcalino, bem como o ácido. Assim, foram destacadas as vantagens de se utilizar o OPH imobilizado na superfície do esporo, pois este poderá ser reutilizado sem a perda da atividade enzimática, uma vez observado seu uso por até seis ciclos, além de ter sido aplicado em condições ambientais adversas. (FALAHATI-POUR et al., 2015).

3.2 Esporos como adjuvantes vacinais

As vacinas representam as formas mais eficazes de prevenção de doenças. Um fator importante a ser considerado para o desenvolvimento de uma vacina são imunostimulantes. Segundo Mata et al.(2013), grande parte dos pesquisadores tem focado seus estudos na identificação do antígeno, mas também avaliar como um antígeno é apresentado, assim como o efeito

imunostimulatório dos componentes da formulação da vacina. Isso indica a necessidade crítica de adjuvantes mais eficazes, capazes de proporcionar de modo eficiente a produção de células específicas B e T de memória (BARNES et al., 2007).

Um estudo de BARNES et al., (2007), mostrou que os esporos de *B. subtilis*, aumentam de forma eficiente populações de células CD4+ e CD8+ contra o antígeno utilizado (TT: tetanus toxoid fragmente C). Além disso, observaram que os esporos utilizados como adjuvantes, induziram uma resposta *T helper*, sendo elevada por repetidas doses com esporos. Foi observado ainda que administração via nasal, levou o aumento de IgA de mucosa e IgG sistêmico contra o antígeno administrado.

O estudo concluiu que os esporos podem ser utilizados como um novo adjuvante de modo eficaz, sem que haja a necessidade de acoplar o esporo quimicamente com o antígeno alvo, além disso, os esporos induzem o aumento da resposta imune contra os antígenos quando administrada via de mucosa ou sistêmica.

Um outro estudo que também utilizou como antígeno o Fragmento C da toxina do tétano (TTFC), expresso em esporos de *B. subtilis* pela fusão com a proteína de membrana dos esporos, Cot C. O estudo também utilizou a subunidade B da toxina termolábil de *E. coli* (LTB). As imunizações intraperitoniais, com ambos antígenos apresentados na superfície dos esporos, apresentaram níveis elevados de IgG específicos. Foi observado ainda que os níveis de anti-TTFC se apresentaram superiores aos de anti-LTB, entretanto ambos exibiram resultados significativamente diferentes dos grupos controles.

Além das imunizações intraperitoniais, imunizações orais também foram feitas, onde os níveis de IgG anti-TTFC se mostraram superiores nos camundongos vacinados com esporos recombinantes (CotC-TTFC), apresentando resultado superior ao grupo vacinado com esporos não recombinantes. Já a resposta de IgG sérica anti-LTB, nos camundongos



imunizados com esporos (CotC-LTB), não se mostrou significativamente acima da resposta obtida em camundongos imunizados com esporos não recombinantes.

Desta forma, o estudo concluiu que a presença dos antígenos na superfície dos esporos não afeta a estrutura dos mesmos, além disso constataram que ambos os antígenos mantiveram sua imunogenicidade quando apresentados na superfície dos esporos, induzindo elevados níveis de IgG no soro, significativamente diferentes dos camundongos controles (imunizados com esporos não recombinantes). Demonstrando o grande potencial dos esporos como apresentadores de antígenos heterólogos e utilização no sistema de vacinas MAURIELLO et al., 2004).

Estudo desenvolvido por ZHOU et al., (2015), utilizaram a proteína Urease B de *Helicobacter pylori*, que é crucial para a sobrevivência da bactéria, pois neutraliza a acidez gástrica. Esta foi expressa na superfície dos esporos de *B. subtilis*, através da fusão com a proteína de superfície CotC. Os esporos recombinantes foram utilizados para imunização oral de camundongos, afim de observar a capacidade de induzir uma resposta humoral e de mucosa, em seguida desafiados quanto a redução da carga bacteriana de *H. pylori* no estômago dos animais.

Os resultados obtidos quanto a imunização oral utilizando esporos recombinantes CotC-Urease B, destacaram resposta de IgA fecal específicas para o antígeno testado, os níveis de IgA foram significativamente maiores no grupo tratado com esporos recombinantes do que no grupo controle (imunizado apenas com esporos não recombinantes). Os níveis séricos de IgG anti-Urease B também foram significativamente maiores nos camundongos imunizados com esporos recombinantes do que nos grupos tratados apenas com esporos não recombinantes.

Os camundongos desafiados por *H. pylori*, 2 semanas após a última imunização com esporos CotC-Urease B, apresentaram uma redução significativa de 84% da carga bacteriana do estômago em comparação com o grupo tratado com esporos não

recombinantes. Desta forma, o estudo sugeriu que a administração oral de esporos recombinantes pode induzir não só imunidade mucosa como também sistêmica, além de ser capaz de fornecer proteção contra *H. pylori*.

A metodologia de apresentação de antígenos por esporos recombinantes também foi testada para a Tuberculose, visto que, a atual vacina BCG, não é totalmente protetora contra tuberculose. DAS e colaboradores (2016) desenvolveram estudo, a fim de encontrar uma nova formulação de vacina para a doença. Uma alternativa foi a utilização de esporos de *Bacillus subtilis* para expressão de dois antígenos principais (Ag85B e o CPF10) imunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os anticorpos IgG produzidos em camundongos imunizados por via intranasal, foram específicos para T85BCFP (fusão dos antígenos Ag85B e CPF10 expressos em *B. subtilis*), não havendo diferenças importantes nos níveis de IgG entre eles. Camundongos imunizados com BCG apresentaram níveis de anticorpos semelhantes aos imunizados com esporos recombinantes. Em conclusão, o estudo indicou que os esporos podem ser projetados como forma de administrar os antígenos de *M. tuberculosis* no sistema imunológico de mucosa, apresentando assim, uma nova via para desenvolvimento de vacinas eficazes contra tuberculose.

Lee e colaboradores (2010) utilizou cepas de *Bacillus subtilis*, modificadas para expressar a proteína VP6 de Rotavírus, buscando induzir respostas imunes e proteção contra Rotavírus após desafio. Foram inoculados, via nasal em camundongos, esporos ou as células vegetativas da cepa recombinante de *Bacillus subtilis*, além disso, para aumentar a imunidade de mucosa, foram adicionados como adjuvantes aos inóculos a Toxina da cólera (CT) ou a forma mutante da Toxina termolábil de *Escherichia coli* (mLT). Os camundongos imunizados foram posteriormente desafiados com Rotavírus murino EDIM EW, e monitorados



diariamente durante 7 dias quanto a perda de vírus nas fezes.

Os camundongos imunizados com células vegetativas recombinantes e esporos recombinantes apresentaram aumento nos níveis de IgG sérico anti-VP6, ao passo que apenas a vacina contendo esporos-VP6 geraram IgA anti-VP6 fecal. Camundongos imunizados com esporos-VP6 mais CT ou mLT, mostraram considerável redução nos níveis de vírus detectados nas fezes, enquanto que os animais vacinados com células vegetativas recombinante não demonstraram redução nos níveis de vírus, em comparação com camundongos controles. O estudo concluiu assim, que a inoculação intranasal de vacinas baseadas em esporos de *B. subtilis*, contra rotavírus, é eficaz na indução de imunidade protetora contra o patógeno quando desafiado pelo mesmo.

3.3 Vacinação e alimentação animal

Os esporos de *B. subtilis* são promissores como apresentadores de antígenos não só para vacinas em seres humanos, mas também para imunizações de animais, podendo ser amplamente utilizado na pecuária, sendo método alternativo capaz de tornar barata e eficaz para as imunizações.

Um dos grandes problemas enfrentados pela indústria avícola é a gripe aviária, a qual apresenta uma ameaça mundial e impacto sobre a economia. Sendo que a imunização existente para combater a doença pode inibir o crescimento das aves e ainda não induzir imunidade de mucosa suficiente (NIU et al., 2009).

Sendo assim, um estudo de MOU e colaboradores (2016), construíram uma cepa recombinante de *Bacillus subtilis* (BS-HA), capaz de expressar a proteína hemaglutinina (HA), do vírus (HPAI) H5N1. Após as imunizações orais feitas em galinhas, observaram níveis elevados específicos de IgA de mucosa que aumentaram consideravelmente 3 a 5 semanas após a vacinação oral com BS-HA em comparação com as imunizações com PBS ou BS.

Os níveis de IgG séricos foram detectados de 1-7 semanas após a primeira

imunização, atingindo o pico de 3-5 semanas após a vacinação com BS-HA, sendo maiores em comparação com as imunizações com PBS ou BS. Além disso, foram observados aumento de peso considerável nas galinhas, após a imunização com BS ou BS-HA, em relação aos demais grupos. Sendo assim, o estudo concluiu que os títulos de IgG e IgA específicos foram impulsionados pela imunização oral com BS-HA, indicando que o *B. subtilis* recombinante efetivamente estimulou resposta imune sistêmica.

Pesquisas anteriores indicaram que a implementação de *B. subtilis* na dieta de animais, exerce um efeito benéfico na microbiota intestinal, aumentando o desempenho do crescimento e melhorando a proporção de conversão alimentar dos mesmos (LEI et al., 2015). Este efeito do *B. subtilis* é devido sua capacidade de produzir amilase, lipase, protease e aminoácidos, o que é capaz de aumentar a eficiência da digestão e absorção de nutrientes (PEDROSO et al., 2006).

LIU e colaboradores (2017), avaliaram as propriedades probióticas de *Bacillus subtilis* HAINUP40 isoladas de meio aquático e as consequências da administração dietética da mesma sobre o desempenho de crescimento, recuperação probiótica intestinal, atividades enzimáticas digestivas, imunidade inata e resistência à doença da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Após a suplementação alimentar das Tilápias com *B. subtilis* HAINUP40 por 8 semanas, o peso corporal final (porcentagem de ganho de peso e taxa de crescimento específica), foram significativamente maiores, entretanto suas taxas de conversão alimentar foram menores, em comparação com o grupo controle. O teste de desafio mostrou que a suplementação utilizando *B. subtilis* HAINUP40 aumentou a proteção contra infecção por *Streptococcus agalactiae*. Os peixes que receberam dieta suplementada, apresentaram menor mortalidade acumulada (40%) do que observado no grupo controle (85%) sendo a porcentagem relativa de sobrevivência (PRS%) foi de 52%.

O estudo concluiu que *Bacillus subtilis* exibe, de fato, a maioria das



propriedades de um bom probiótico. A administração oral de *B. subtilis* HAINUP40 melhorou o desempenho do crescimento da Tilápia e as atividades enzimáticas digestivas, além de melhorar a imunidade e resistência contra doença causada por *S. agalactiae*, se mostrando uma metodologia ideal para aumentar o crescimento e resistência imune para Tilápia do Nilo.

4. Considerações Finais

Considerando o exposto, fica claro o grande potencial de aplicação dos *Bacillus subtilis* tanto para a indústria, saúde humana e animal. Os relatos encontrados na literatura, demonstram grandes benefícios na utilização dos esporos tanto manipulados geneticamente como submetido a adsorção física ou química da molécula em estudo, seja para fins vacinais e imobilização de enzimas.

A esta capacidade adjuvante e de superfície de adsorção soma-se a elevada resistência térmica, a extremos de pH e pressão. Maiores estudos devem ser realizados buscando investigar tanto novas rotas de recombinação quanto de aplicação desta ferramenta polivalente.

Divulgação

Este artigo de revisão é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta revisão, por meio eletrônico.

Referências

BARNES AG, CEROVIC V, HOBSON PS, KLAVINSKIS LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 6, p. 1538–1547, 2007.

DAS, K.; THOMAS, T.; GARNICA, O.; DHANDAYUTHAPANI, S. Recombinant *Bacillus subtilis* spores for the delivery of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-CFP10

secretory antigens. *Tuberculosis (Edinb)*. v. 101S:S18-S27. 2016. doi: 10.1016/j.tube.2016.09.016.

DE SOUZA, R.D.; BATISTA, M.T.; LUIZ, W.; CAVALCANTE, R.C.; AMORIM, J.H.; BIZERRA, R.S.; MARTINS, E.G.; FERREIRA, L.C. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS One**, v. 27;9(1):e87454, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087454.

DUC LE, H.; HONG, H.A.; ATKINS H.S.; FLICK-SMITH, H.C.; DURRANI, Z.; RIJPKEMA, S.; TITBALL, R.W.; CUTTING, S.M. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**. v. 25 (2), p. 346-55, 2007.

DUC, L.H.; CUTTING, S.M. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. **Expert opinion on biological therapy**, v. 3, n. p. 1263–1270, 2003.

FALAHATI-POUR, S.K.; LOTFI, A.S.; AHMADIAN, G.; BAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of recombinant organophosphorus hydrolase on spores of *Bacillus subtilis*. **J Appl Microbiol**. v. 118 (4), p. 976-88. 2015 doi: 10.1111/jam.12744.

GHAEDMOHAMMADI, S.; RIGI, G.; ZADMARD, R.; RICCA, E.; AHMADIAN, G. Immobilization of Bioactive Protein A from *Staphylococcus aureus* (SpA) on the Surface of *Bacillus subtilis* Spores. **Mol Biotechnol**, v. 57 (8), p. 756-66, 2015.

GOMES, P.A.; BENTANCOR, L.V.; PACCEZ, J.D.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; PALERMO, M.S.; FERREIRA, R.C.; FERREIRA, L.C. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Braz J Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 333–8, 2009. doi: 10.1590/S1517-838220090002000023.

HINC, K.; ISTICATO, R.; DEMBEK, M.; KARCZEWSKA, J.; IWANICKI, A.; PESZYŃSKA-SULARZ, G.; DE FELICE M.; OBUCHOWSKI, M.; RICCA E. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores.



Microb Cell Fact. v. 18, p. 9-2, 2010. doi: 10.1186/1475-2859-9-2.

HOSSEINI-ABARI, A.; KIM, B.G.; LEE, S.H.; EMTIAZI, G.; KIM, W.; KIM, J.H. Surface display of bacterial tyrosinase on spores of *Bacillus subtilis* using CotE as an anchor protein. **J Basic Microbiol**, v. 56 (12), p.1331-1337, 2016. doi: 10.1002/jobm.201600203.

ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H.T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D.; OGGIONI, M.R.; DE FELICE, M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **J Bacteriol**, v. 183, n. 21, p. 6294–301, 2001.

ISTICATO, R.; RICCA, E. Spore Surface Display. **Microbiol Spectr**. v. 2(5), 2014. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0011-2012.

ISTICATO, R.; SIREC, T.; TREPPICIONE, L.; MAURANO, F.; DE FELICE, M.; ROSSI, M.; RICCA, E. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. **Microb Cell Fact.** v.29, p.12-98. 2013.

KIM, J.; SCHUMANN, W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. **Cell Mol Life Sci**. v. 66 (19), p. 3127-36, 2009. doi: 10.1007/s00018-009-0067-6.

LEE, S.; BELITSKY, B.R.; BRINKER, J.P.; KERSTEIN, K.O.; BROWN, D.W.; CLEMENTS, J.D.; KEUSCH, T.; TZIPORI, S.; SONENSHEIN, A.L.; HERRMANN, J.E. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17(11), p.1647-55, 2010. doi: 10.1128/CVI.00135-10.

LEI, X.; PIAO, X.; RU, Y.; ZHANG, H.; PÉRON, A.; ZHANG, H. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 28(2), p. 239-46. 2015. doi: 10.5713/ajas.14.0330.

LIU, H.; WANG, S.; CAI, Y.; GUO, X.; CAO, Z.; ZHANG, Y.; LIU, S.; YUAN, W.; ZHU, W.; ZHENG, Y.; XIE, Z.; GUO, W.; ZHOU, Y. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive

enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 60, p. 326-333, 2017. doi: 10.1016/j.fsi.2016.12.003.

MATA, E.; SALVADOR, A.; IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; PEDRAZ, J.L. Malaria vaccine adjuvants: latest update and challenges in preclinical and clinical research. **Biomed Res Int**, v. 2013, 2013. doi: 10.1155/2013/282913.

MAURIELLO, E.M.; DUC, L.E.H.; IISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H.A.; DE FELICE, M.; RICCA, E.; CUTTING, S.M. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22(9-10), p.1177-87, 2004.

MOU, C.; ZHU, L.; YANG, J.; XU, W.; CHENG, X.; YANG, Q. Immune Responses Induced by Recombinant *Bacillus Subtilis* Expressing the Hemagglutinin Protein of H5N1 in chickens. **Sci Rep**. v.16(6), p. 38403. 2016. doi: 10.1038/srep38403.

NIU, Z. Y.; LIU, F. Z.; YAN, Q. L. & LI, W. C. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. **Poultry Science**, v. 88, p. 2101–2107, 2009. doi: 10.3382/ps.2009-00220

PAN, J.G.; KIM, E.J.; YUN, C.H. *Bacillus* spore display. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 610–612, 2012.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.; LAMBAIS, M.R.; RACANICCI, A.M.; LONGO, F.A.; SORBARA, J.O. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poult Sci**, v. 85(4), p.747-52, 2006.

RICCA, E.; BACCIGALUPI, L.; CANGIANO, G.; DE FELICE, M.; IISTICATO, R. Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Microb Cell Fact**, v. 12, p. 13-115, 2014. doi: 10.1186/s12934-014-0115-2.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can J Microbiol**. v.50 (1), p.1-17, 2004.

WANG, H.; WANG, Y.; YANG, R. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface



Biotechnologia

display: concept, progress, and future. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.101(3), p. 933-949, 2017. doi: 10.1007/s00253-016-8080-9.

WU, C.H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production. **Trends Microbiol**, v. 16(4), p.

181-8, 2008. doi: 10.1016/j.tim.2008.01.003.

ZHOU, Z.; GONG, S.; LI, X.M.; YANG, Y.; GUAN, R.; ZHOU, S.; YAO, S.; XIE, Y.; OU, Z.; ZHAO, J.; LIU, Z. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. **J. Med Microbiol**, v. 64 (1) p. 104-10. 2015 doi: 10.1099/jmm.0.076430-0.