

USO DE UNA BIOPELÍCULA DE ORIGEN BACTERIANO COMO PROMOTORA DEL CRECIMIENTO SOBRE LA ESPECIE HORTÍCOLA *Lactuca sativa* (LECHUGA)

Sarti Gabriela Cristina

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Agronomía, UBA, Av. San Martín 4453 C1417DSE Buenos Aires

karibu@agro.uba.ar

RESUMEN

Las bacterias del género *Bacillus* poseen una reconocida actividad como promotoras del crecimiento vegetal. Dependiendo de las condiciones de cultivo, las células de *B. subtilis* cambian de tener un crecimiento de vida libre como células planctónicas, a convertirse en células no móviles para formar una biopelícula. Por otra parte, en condiciones de limitación de nutrientes o en respuesta a condiciones ambientales adversas las células de *Bacillus* detienen su normal proceso de división celular para dar inicio a otro proceso altamente organizado que culmina con la producción de una espora muy resistente.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1-Optimizar las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula robusta y su vinculación con el proceso de esporulación. 2- Evaluar el efecto de la inoculación de semillas de *Lactuca sativa* var. *Crimor* cuando *Bacillus subtilis* fue aplicado en su estado planctónico y bajo la forma de biopelícula.

Se utilizó *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* crecida en medio salino suplementado con distintas fuentes carbonadas simples, aminoácidos y bajo distintas velocidades de agitación. Los recuentos bacterianos se realizaron a través de diluciones seriadas y siembra en placas con agar nutritivo. Para el ensayo de inoculación, el crecimiento bacteriano fue sin agitación para el caso de la biopelícula y a 150 rpm para el inóculo líquido (estado planctónico). Las semillas de *Lactuca sativa* var. *Crimor* fueron sembradas e inoculadas con un cultivo líquido de la bacteria (en su forma de vida planctónica) mientras que en otras semillas se depositó asépticamente una fina porción de la biopelícula. Se preparó para la siembra una mezcla de tierra y compost en proporción 3:1 (sustrato). Se realizaron tratamientos utilizando esta mezcla tinalizada (sustrato empobrecido) y sin tinalizar (sustrato fértil). Los resultados mostraron que las fuentes carbonadas más eficaces para la formación de la biopelícula fueron glicerol, glucosa y manitol, siendo la primera la más resistente a los procesos degradativos. La fuente nitrogenada óptima fue ácido L-glutámico. La biopelícula solo

pudo desarrollarse en condiciones estáticas o cuando la agitación fue baja (80rpm). No se detectaron diferencias en el número de esporas liberadas en presencia o ausencia de biopelícula.

Bacillus actuó como promotor del crecimiento sobre *Lactuca sativa* var. *Crimor*, resultando efectiva tanto cuando se la aplicó en su estado planctónico como de biopelícula. El efecto promotor del crecimiento vegetal se observó tanto en el sustrato fértil como en el sustrato empobrecido en nutrientes y microorganismos, aunque fue mayor sobre éste último. Así mismo la biopelícula tuvo mayor efecto benéfico como inoculante que la forma planctónica. Estos resultados sugieren que la estructura de la biopelícula le permitiría a la bacteria adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, sobre la semilla, favoreciendo la supervivencia y actividad benéfica de la misma sobre la planta.

Este trabajo sugiere que la aplicación de biopelículas como inoculante de semillas es una alternativa novedosa para el desarrollo de una agricultura sustentable, que aumente los rindes de los cultivos sin provocar los problemas ambientales vinculados con los fertilizantes químicos.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, biopelículas, *Lactuca sativa*

ABSTRACT

Bacillus bacteria have a recognized activity as plant growth promoters. Depending on the culture conditions, *B. subtilis* cells change from having a free-living growth like planktonic cells to non-mobile cells to form a biofilm. On the other hand, under conditions of nutrient limitation or in response to adverse environmental conditions the *Bacillus* cells stop their normal process of cell division to start another highly organized process that culminates with the production of a very resistant spore.

The objectives of this work were: 1-Optimize crop conditions for the development of a robust biofilm and its linkage with the sporulation process. 2- Evaluate the effect of inoculation of seeds of *Lactuca sativa* var. *Crimor* when *Bacillus subtilis* was applied in its planktonic state and in the form of biofilm.

Bacillus subtilis subsp. *Spizizenii* grown in saline medium supplemented with different single carbon sources, amino acids and under different stirring rates. Bacterial counts were performed through serial dilutions and plated on nutrient agar plates. For the inoculation test, the bacterial growth was without agitation for the biofilm case and at 150 rpm for the liquid inoculum (planktonic state). *Lactuca sativa* seeds of var. *Crimor* were planted and inoculated with a liquid culture of the bacteria (in their planktonic life form) while in other seeds a fine portion of the biofilm was deposited aseptically. A mixture of soil and compost in a 3: 1 ratio (substrate) was

prepared for sowing. Treatments were performed using this blend (immobilized substrate) and without tinalizing (fertile substrate). The results showed that the most efficient carbon sources for biofilm formation were glycerol, glucose and mannitol, the first being the most resistant to the degradation processes. The optimal nitrogen source was L-glutamic acid. The biofilm could only be developed under static conditions or when the agitation was low (80rpm). No differences were detected in the number of spores released in the presence or absence of biofilm.

Bacillus acted as a growth promoter on *Lactuca sativa* var. Crimor, proving effective both when applied in its planktonic state and biofilm. The plant growth promoting effect was observed in both the fertile substrate and the substrate depleted in nutrients and microorganisms, although it was greater on the latter. Also, the biofilm had greater beneficial effect as an inoculant than the planktonic form. These results suggest that the structure of the biofilm would allow the bacteria to adapt to the new environmental conditions, on the seed, favoring the survival and beneficial activity of the same on the plant.

This work suggests that the application of biofilms as a seed inoculant is a novel alternative for the development of a sustainable agriculture that increases yields without causing the environmental problems associated with chemical fertilizers.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biofilm, *Lactuca sativa*

INTRODUCCIÓN

Bajo el nombre de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, (PGPB) se encuentran bacterias que colonizan la rizósfera y rizoplano y se denominan “rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal” (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), las cuales se adhieren a la superficie radicular (Kloepper y Schroth, 1978, Kloepper y otros, 1999,), en algunos casos pueden introducirse en el interior de la raíz y establecerse como poblaciones endofíticas (Gray y Smith, 2005) realizando simbiosis. Estas rizobacterias se asocian a muchas especies de plantas y se las encuentra en diversos ambientes. Bacterias con actividad PGPR pertenecen a los géneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Hurek, 2003).

Las bacterias del género *Bacillus* son Gram positivas, aerobios estrictos en su mayoría, móviles, se encuentran comúnmente en el suelo, son ubicuas y no son consideradas patógenas o toxicogénicas en humanos, plantas o animales (Bergey's, 1975). Son excelentes productores de antimicrobianos, (producen más de dos docenas de antibióticos donde la clase predominante es de naturaleza

proteica) (Stein, 2005), lo cual ha permitido utilizarlas como un importante agente de control biológico.

Dependiendo de las condiciones de cultivo, *B. subtilis* produce una biopelícula en la interfase aire-líquido (Morikawa, 2008). Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz extracelular formada principalmente por exopolisacáridos (EPS) y en menor cantidad proteínas, DNA y productos de lisis bacteriana (Stanley y Lazazerra, 2005). Estas estructuras representan una antigua estrategia de supervivencia procariótica, debido a que las mismas proporcionan protección frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, concentrando nutrientes y facilitando la eliminación de desechos.

Durante el desarrollo de la biopelícula las células de *B. subtilis* cambian de tener un crecimiento de vida libre como (células planctónicas), flageladas y móviles a convertirse en células no móviles que crecen en largas cadenas paralelas formando racimos.

Por otra parte, en condiciones de limitación de nutrientes o en respuesta a condiciones ambientales adversas como falta de alimento, desecación como también debido a un aumento en la densidad de la población microbiana las células de *Bacillus* detienen su normal proceso de división celular para dar inicio a otro proceso altamente organizado que culmina con la producción de una espora muy resistente (Kuwana y otros, 2007). Si bien el proceso que regula la esporulación ha sido extensamente estudiado en sistemas líquidos (Sonenshein y otros, 2002; Piggot y Hilbert 2004), estos trabajos se orientaron bajo la perspectiva de observación de una simple célula y no, como un proceso que ocurre dentro de una comunidad espacialmente organizada como es una biopelícula.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1-Optimizar las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula robusta y su vinculación con el proceso de esporulación. 2- Evaluar el efecto de la inoculación de semillas de *Lactuca sativa* var. *Crimor* cuando *Bacillus subtilis* fue aplicado en su estado planctónico y bajo la forma de biopelícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

1.1 La cepa de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* fue obtenida de la colección de cultivos de la Facultad de Agronomía (UBA).

1.2. *Bacillus* se cultivó en medio mínimo salino (MMS) cuya composición fue: (g/l): K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 0,30; NH_4Cl , 0,5; NH_4NO_3 , 0,1; Na_2SO_4 , 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $1 \cdot 10^{-3}$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $1 \cdot 10^{-3}$; $CaCl_2$, $5 \cdot 10^{-4}$; EDTA, 0,01; pH 7.

1.3. Condiciones de cultivo y extracción de biopelícula

Bacillus se cultivó en condiciones estáticas para permitir la formación de la biopelícula. En todos los casos la incubación fue a 30°C durante 96h. Las biopelículas formadas se separaron con una varilla de vidrio cuando la robustez de la misma lo permitía o por filtración al vacío en el caso de películas frágiles. En todos los casos las biopelículas fueron secadas a 40°C hasta peso constante.

1.4. Efecto de las fuentes carbonadas sobre la formación de la biopelícula.

La bacteria se cultivó en MMS suplementado con 1% de fuentes carbonadas simples: glucosa, galactosa, fructosa, xilosa, hexano, glicerol, manitol y también se probó la sustancia biodiesel. En todos los casos se utilizó el aminoácido ácido L-glutámico 55mM como fuente nitrogenada.

1.5. Efecto de los aminoácidos sobre la formación de la biopelícula.

La bacteria se cultivó en medio mínimo salino (MMS) suplementado con glicerol 1% como fuente carbonada y se utilizaron distintos aminoácidos en concentración 55mM: ácido L-glutámico, ácido L-aspartico, L-lisina, L-triptofano y sin el agregado de aminoácido. Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo que en 1.3. y posteriormente fueron pesadas.

1.6. Recuentos bacterianos.

Los recuentos bacterianos se realizaron a través de diluciones seriadas y siembra en placas con agar nutritivo durante 48h a 30°C (Frioni 2006).

2. Ensayos de Inoculación de semillas de *Lactuca sativa*.var *Crimor*

2.1. Desinfección de semillas

Las semillas de *Lactuca sativa* variedad *Crimor* fueron desinfectadas con alcohol 70° y lavadas tres veces con agua destilada estéril.

2.2. Cultivo bacteriano

Para los ensayos con bacterias en estado planctónico y para la biopelícula se utilizó medio mínimo salino líquido (MMS) con glicerol 1% y ácido glutámico 55mM. El crecimiento bacteriano fue sin agitación para el caso de la biopelícula y a 150 rpm para el inóculo líquido (estado planctónico).

2.3. Tindalización del sustrato

Se utilizó una mezcla 2:1 tierra y compost (relación C/N 19, Nitrógeno 0,4% y materia orgánica 12%), a esta mezcla se la denominó “sustrato”. Posteriormente una porción de sustrato se tinalizó en autoclave a 124,2 hPa durante 1 hora durante tres días consecutivos (Benintende y otros, 2009).

2.4. Inoculación de semillas con *Bacillus* en estado planctónico

Las semillas fueron depositadas en macetas de 10cm x 15cm, sobre ellas se inoculó 3ml del inóculo líquido de la bacteria crecidas según 1.7.2. Luego un set de macetas fueron rellenas con sustrato sin tinalizar y otras con sustrato tinalizado según 2.3. El ensayo se realizó a una temperatura media de 20°C, en invernáculo durante 20 días.

2.5. Inoculación de semillas con *Bacillus* como biopelícula

Sobre las semillas se colocó asépticamente una porción de biopelícula recién obtenida según 2.2. y se mezcló. Luego un grupo de macetas fueron rellenas con sustrato sin tinalizar y otras con sustrato tinalizado según 2.3. El ensayo se realizó a una temperatura media de 20°C, en invernáculo durante 20 días.

2.6. Tratamientos de inoculación

Los tratamientos de inoculación realizados sobre semillas de *Lactuca sativa* variedad Crimor fueron:

- a) Semillas inoculadas con la bacteria en su forma **planctónica** sobre sustrato **sin tinalizar**.
- b) Semillas inoculadas con la bacteria en su forma de **biopelícula** sobre sustrato **sin tinalizar**.
- c) Semillas inoculadas con la bacteria en su forma **planctónica** sobre sustrato **tinalizado**.
- d) Semillas inoculadas con la bacteria en su forma de **biopelícula** sobre sustrato **tinalizado**.

Se realizaron controles sin inocular sobre semillas germinadas sobre sustrato tinalizado y sin tinalizar

2.7. Variables evaluadas sobre el material vegetal

Se pesaron las plántulas enteras, luego se separó la parte aérea y la raíz, cortando cada plántula a la altura del cuello y se pesaron por separado en una balanza de precisión (materia fresca).

3. Análisis estadístico

Se evaluó en términos de porcentajes aritméticos y desviaciones estándar, 3 repeticiones. Para los ensayos de inoculación de *Lactuca sativa* se utilizó el test de ANOVA, los cálculos fueron realizados con *Infostat* Software (Di Rienzo, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

-Efecto de fuentes carbonadas sobre la formación de la biopelícula

Se estudió el efecto de distintas fuentes carbonadas en un medio mínimo de sales con el agregado de ácido L- glutámico como fuente nitrogenada simple.

Figura 1. Biopelículas desarrolladas *B. subtilis* subsp. *spizizenii* bajo distintas fuentes carbonadas

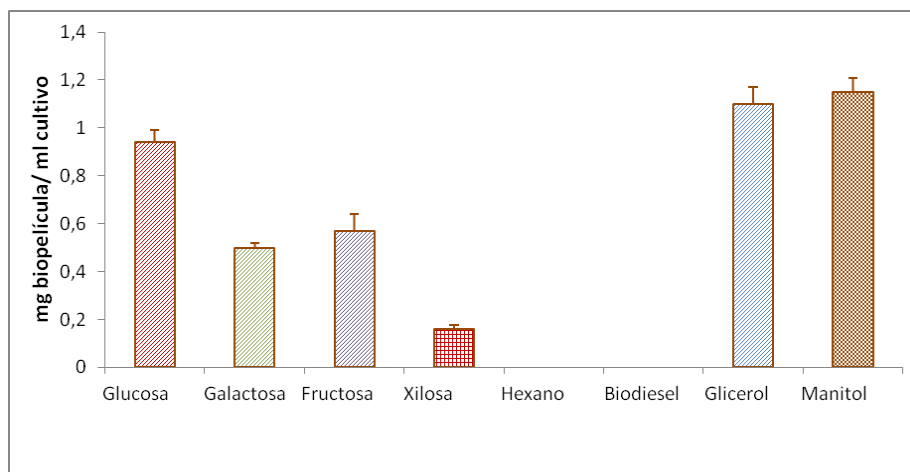


Figura 1. Biopelículas formadas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en (MMS), ácido L-glutámico 55mM y diferentes fuentes carbonadas en concentración 1%

Dentro de las fuentes carbonadas simples seleccionadas (a excepción del biodiesel), las más eficaces para la formación de la biopelícula fueron glicerol, glucosa y manitol. Con el uso de fuentes carbonadas como galactosa y fructosa se obtuvo menor cantidad de biopelícula y con xilosa

(una pentosa) la bacteria formó la menor cantidad de biopelícula. Con el agregado al medio de cultivo del hidrocarburo hexano y biodiesel la bacteria fue capaz de crecer pero no desarrolló biopelícula (Figura 1). Según Monds (2009), para la síntesis de biopelícula la glucosa fue el sustrato de elección.

-Tiempo de disgregación de las biopelículas

Figura 2. Tiempo de disgregación de las biopelículas desarrolladas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii*

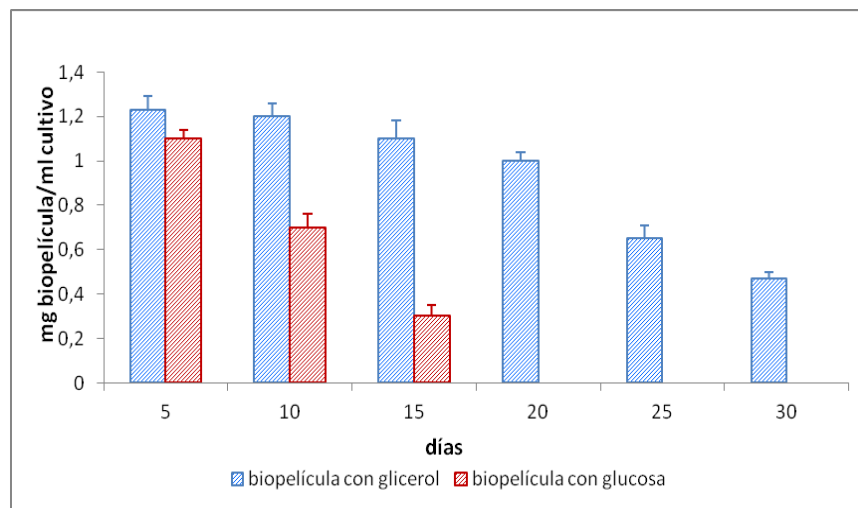


Figura 2. Tiempo de disgregación de las biopelículas formadas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en (MMS), ácido L-glutámico 55mM y diferentes fuentes carbonadas en concentración 1% a 25°C

La biopelícula obtenida utilizando glicerol 1% fue muy resistente a los procesos degradativos (Figura 2) debido a que a 25°C no mostró signos de degradación hasta después de 15 días y mantenida a (4°C) permaneció sin signos importantes de alteración por 30 días. Para el caso de la biopelícula desarrollada a partir de glucosa 1%, a 25°C mostró signos de disgregación durante la primera semana y a las dos semanas el 75% de la misma se había desintegrado.

-Efecto de distintos aminoácidos sobre la formación de las biopelículas

Se comparó el efecto de aminoácidos que en su composición poseían 4, 5 y 6 carbonos en una estructura lineal y un aromático sobre el desarrollo de la biopelícula.

Figura 3. Biopelículas desarrolladas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* con diferentes aminoácidos

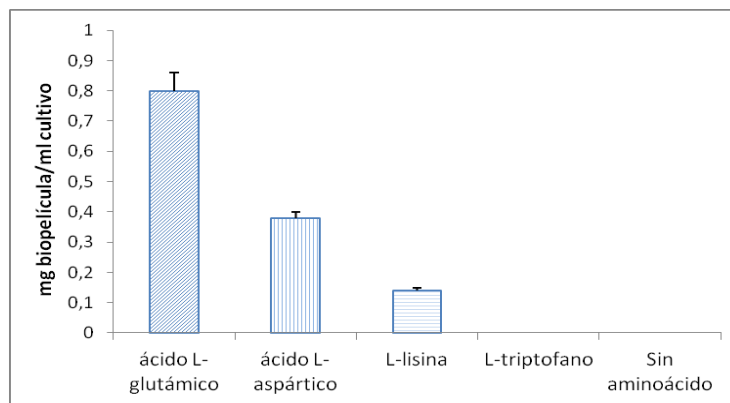


Figura 3. Biopelículas formadas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en (MMS), glicerol 1% y diferentes aminoácidos en concentración 55mM

El aminoácido más adecuado como fuente de N para el desarrollo de la biopelícula fue el ácido L-glutámico (Figura 3).

Efecto de la agitación sobre la formación de las biopelículas y esporulación

Figura 4. Formación de biopelícula, células viables y esporas en la biopelícula formada por *B. subtilis* subsp *spizizenii*

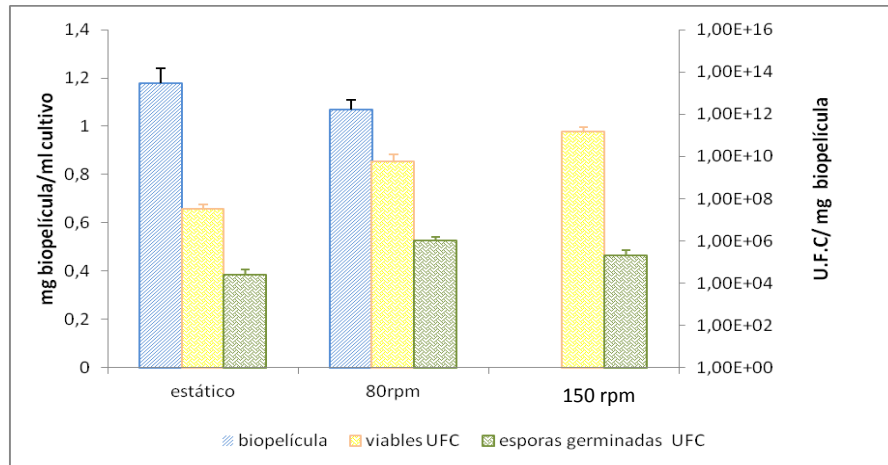


Figura 4. A Formación de biopelícula, células viables y esporas en la biopelícula formada por *B. subtilis* subsp *spizizenii* en medio mínimo salino glicerol1% ácido L-glutámico 55 mM a las 96h 30°C en condiciones estáticas a 80rpm y 150rpm.

La biopelícula solo pudo desarrollarse en condiciones estáticas o cuando la agitación fue baja (80rpm) (Figura 4). Paul (2012) quien trabajo con biopelículas de *Pseudomonas* sp. desarrolladas a partir de aguas residuales de uso doméstico, también reportó que a bajas condiciones de agitación la biopelícula fue capaz de desarrollarse y mantener su cohesión. Cuando se mantuvo agitación constante de 150 rpm la biopelícula no logró desarrollarse, pero sí estuvo favorecido el crecimiento bacteriano, siendo el incremento de dos órdenes de magnitud.

Para el caso de las biopelículas, y el proceso de esporulación existen controversias, Hall-Stoodley (2005) considera a las biopelículas como “nidos” desde los cuales se produce la liberación de células vegetativas al ambiente. Sin embargo, Wijman (2007) sugiere que la esporulación más eficiente se encontró sobre la biopelícula y no en el medio líquido, sugiriendo que la misma actuaría como nido para la formación y liberación de esporas.

En este trabajo, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* no mostro actuar como “nido” para la liberación de esporas debido a que no se encontraron diferencias en cuanto al número de esporas detectadas en presencia y en ausencia de biopelícula. Estos resultados podrían sugerir que para esta bacteria la biopelícula no actuaría como un inductor para el proceso de esporulación.

Efecto de la inoculación de semillas de *Lactuca sativa* variedad *Crimor* con *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*

Figura 5. Crecimiento de *Lactuca sativa* var. *Crimor* en sustrato sin tindalizar inoculadas sus semillas con *B. subtilis* subsp. *spizizenii*

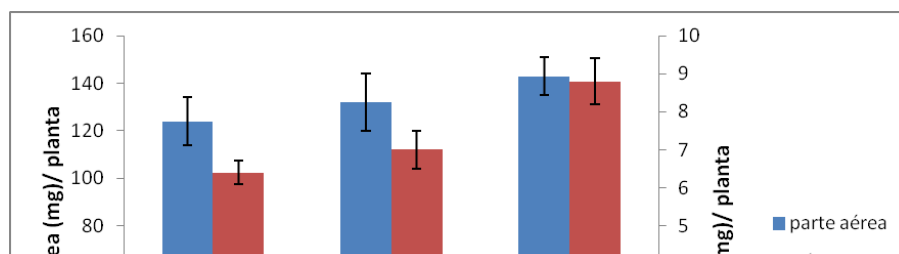


Figura 5. Crecimiento de parte aérea y raíz de plántulas de *Lactuca sativa* de 20 días crecidas en sustrato sin tindalizar inoculadas sus semillas con *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en su forma planctónica y biopelícula. El control corresponde a plántulas sin inocular

Se comparó el desarrollo de las plántulas luego de 20 días con respecto a su masa, en la parte aérea y raíz, cuando las mismas crecieron en un sustrato sin tindalizar.

Se compararon los parámetros de crecimiento en las plántulas cosechadas a los 20 días cuando el sustrato no fue tindalizado (sustrato fértil) (Figura 5). En este caso no se observaron diferencias significativas respecto del control sobre la parte aérea de las plántulas inoculadas con los dos tratamientos (inóculo planctónico y biopelícula), pero si se observaron diferencias significativas en el crecimiento radicular, siendo la biomasa radicular un 30% mayor que el control en el ensayo donde se aplicó la biopelícula.

Se observó el efecto estimulador de la bacteria promotora del crecimiento sobre la raíz, aunque este efecto no fue traducido a la parte aérea de la planta, esto podría deberse a que las plántulas fueron cosechadas a una edad temprana de 20 días y posiblemente el efecto benéfico sobre el desarrollo de las hojas se observe en estadíos posteriores del cultivo.

Figura 6. Crecimiento de *Lactuca sativa* var. *Crimor* en sustrato tindalizado inoculadas sus semillas con *B. subtilis* subsp. *spizizenii*

-

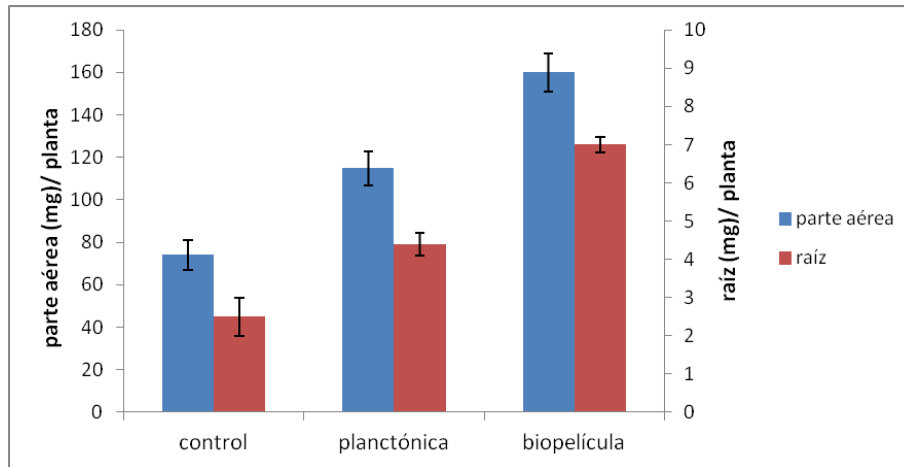


Figura.6. Crecimiento de parte aérea y raíz de plántulas de *Lactuca sativa* de 20 días en sustrato tinalizado inoculadas sus semillas con *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en su forma planctónica y biopelícula. Control: plántulas sin inocular

Se comparó el desarrollo de las plántulas luego de 20 días con respecto a su masa, en la parte aérea y raíz cuando las mismas crecieron en un sustrato tinalizado.

En la Figura 6 se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Con respecto a los valores de masa de la parte aérea, las semillas inoculada con la bacteria en su forma planctónica mostraron un aumento del 40% mientras que al usar la biopelícula el aumento supero el 100% con respecto al control.

Con respecto al desarrollo de raíces, se observó un aumento del 80% y superior al 100% con respecto al control, cuando fue inoculada en su forma planctónica y como biopelícula respectivamente. Estos resultados sugieren que la aplicación de la biopelícula a la semilla lograría una inmovilización de las células de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* dentro de esa estructura que permitiría el efecto promotor del crecimiento sobre la planta de lechuga.

CONCLUSIONES

El glicerol y el ácido L-glutámico fueron las fuentes carbonadas y nitrogenadas óptimas para el desarrollo de la biopelícula en *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. Esta bacteria mostró actividad promotora del crecimiento vegetal cuando se inoculó sobre la especie hortícola *Lactuca sativa* (lechuga) variedad *Crimor*. La bacteria fue efectiva sobre suelos empobrecidos, cuando se inoculó su forma planctónica y más aún cuando se aplicó la biopelícula. Asimismo, la estructura de la biopelícula le permitiría a la bacteria adaptarse a las nuevas condiciones ambientales cuando la

misma se puso en contacto con la semilla, favoreciendo la supervivencia y actividad benéfica de la bacteria sobre la planta.

Este trabajo sugiere que la aplicación de biopelículas como inoculante de semillas sería una alternativa novedosa para el desarrollo de una agricultura sustentable, que aumente los rindes de los cultivos sin provocar los problemas ambientales vinculados con los fertilizantes químicos.

BIBLIOGRAFÍA

Benintende, S., Sanchez, C., and Chaduj, A. (2009). Guía de Trabajos Prácticos, Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Oro Verde. Provincia de Entre Ríos. Argentina.

Bergey's 1975. Manual of determinative bacteriology. Eight Edition 529-550.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2008) Infostat Software. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Frioni, L. 2006. Microbiología Básica, Ambiental y Agrícola. Editorial de la Facultad de Agronomía. Uruguay.

Gray, E. and Smith, D. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, (37), 395-412.

Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (2003). Azoarcus sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Biological Journal of Biotechnology*, (106), 169-178.

Kloepper, J. and Schroth, M. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie (ed.), Proceedings of the 4th International Conference on plant Pathogenic Bacteria, vol. II, 879-882.

Kloepper, J., Rodriguez-Ubana, R., Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E. and Fernandez, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential uiminen to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, (28), 21-26.

Kuwana, R., Takamatsu, H. and Wataba, K. (2007). Expression, Localization and Modification of Spore Coat Protein in *Bacillus subtilis*. *Journal Biochemistry*, 142 (6), 681-689.

Hall Stoodley. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*, (13), 7-10

Monds, R. and G. O'Toole. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review *Trends in Microbiology*, 17(2):73-86.

Morikawa, M. (2008). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1 (101), 1-8.

Paul, E., Ochoa, J., Pechaud, Y., Liu, Y. and Line Y. (2012). Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Research*, (46), 5499-5508.

Piggot, P. J., Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion Microbiology*, (7), 579-586.

Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. (2002). *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press; Washington DC.

Stanley N, and Lazazzera B. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly DL glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 57(4):1143-1158.

Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific microbiology. *Molecular Microbiology*, 56 (4) 845-857.

Wijman, J., Moezelaar, R., Zwietering M., Abee T. 2007. Air-Liquid Interface Biofilms Of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, (73), 1481-1488.