



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIC

KAMILLA ANGEL DA SILVA
TALITA LACERDA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis* COM
POTENCIAL DE CONTROLE DE MICRORGANISMOS**

BRASÍLIA - DF

2018



KAMILLA ANGEL DA SILVA
TALITA LACERDA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis* COM
POTENCIAL DE CONTROLE DE MICRORGANISMOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.
Orientação: Paulo Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA - DF

2018

IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL DE CONTROLE DE MICRORGANISMOS

Kamilla Angel da Silva – UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista
kamilla.angel@sempreceub.com

Talita Lacerda de Oliveira – UniCEUB, PIC institucional, aluno voluntário
talita2896@sempreceub.com

Paulo Roberto Martins Queiroz – UniCEUB, professor orientador
paulo.silva@edu.ceub.br

Bacillus thuringiensis (Bt) é um bacilo Gram positivo produtor de bacteriocinas que tem ação bacteriolítica ou bacteriostática sobre microrganismos patogênicos. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos que atuam contra bactérias Gram positivas e negativas e diferem entre si quanto a composição de aminoácidos, biossíntese, transporte e modo de ação. Nos alimentos, as bacteriocinas podem ser encontradas naturalmente como produtos da microbiota normal ou introduzida. O objetivo desse projeto foi isolar estirpes de *Bacillus thuringiensis* a partir de amostras de solos do Distrito Federal e verificar a produção de bacteriocinas com potencial de inibição de microrganismos. Foram isoladas e caracterizadas nove estirpes de *Bacillus thuringiensis* (Bac, P4, B01, B02, B03, B04, B05, B06 e B07). Cada estirpe foi testada quanto ao potencial de inibição por meio de bioensaios de confronto por estrias e por Well Difusion contra bactérias patogênicas (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp.) e contra as estirpes de Bt isoladas. Os bioensaios por estrias foram realizados como triagem para a seleção das estirpes de Bt produtoras de bacteriocinas. Os ensaios foram mantidos a 28 °C por 24 h a 72 h. Após a seleção das estirpes de Bt com potencial de inibição, realizou-se o bioensaio por Well Difusion para a confirmação da melhor estirpe de Bt produtora de bacteriocinas. Os bioensaios foram mantidos a 28 °C por 24 h seguindo-se a medição dos halos. A confirmação da produção de bacteriocina foi realizada por uma cinética de crescimento durante 48 h, com coletas realizadas em intervalos de tempo determinados. A estirpe de Bt denominada Bac apresentou o melhor potencial de inibição sobre as demais estirpes de Bt e a cinética de produção de bacteriocinas mostrou que esse peptídeo é produzido e secretado em momentos específicos do crescimento da estirpe de Bt. Vale ressaltar que essa bacteriocina não inibiu as bactérias patogênicas testadas, indicando a necessidade de ampliar os testes contra outras espécies de bactérias patogênicas. Sendo assim, bacteriocinas produzidas por estirpes de *B. thuringiensis* podem ser utilizadas na inibição do crescimento de microrganismos, indicando um potencial de uso biotecnológico dessa proteína, visando o desenvolvimento de produtos de interesse biomédico.

Palavras-Chave: Bacteriocinas. Biocontrole. Well Diffusion. Bioensaios.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| RESUMO..... | 3 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 5 |
| 2. OBJETIVO..... | 6 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 6 |
| 4. METODOLOGIA..... | 8 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 10 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma espécie de eubactéria pertencente ao Filo Firmicutes, da Classe Firmibacteria, Ordem Eubacteriales, Família Bacillaceae do Gênero *Bacillus* (SNEATH *et al.*, 1986; DROBNIIEWSKI, 1993). O bacilo da espécie *Bacillus thuringiensis* foi isolado pela primeira vez em 1901 no Japão a partir da fase larval do inseto *Bombyx mori* (mariposa), pertencente à Ordem Lepidoptera. Em 1911 esta bactéria foi isolada pelo alemão Berliner, em uma lagarta, *Anagasta kuehniella*, que também é uma mariposa e, a partir deste isolamento, o bacilo recebeu o nome atual *Bacillus thuringiensis* em homenagem a uma província alemã (POLANCZYK; ALVES, 2003; SILVA, 2008). Em 100 anos de história do *B. thuringiensis* já foram identificadas mais de 40.000 estirpes demonstrando a variabilidade desta bactéria na natureza, permitindo o estudo detalhado de cada uma destas estirpes e sorotipos do bacilo (CÍCERO *et al.*, 2009).

Segundo Heng e colaboradores (2007), as bactérias do gênero *Bacillus* produzem substâncias capazes de inibir outros microrganismos, conhecidas como bacteriocinas. Elas são peptídeos que possuem ação antimicrobiana contra algumas estirpes diferentes de *Bacillus thuringiensis* e outras bactérias (BOWDISH *et al.*, 2005; RASI, 2010). A primeira bacteriocina descoberta foi a thuricina, que tem capacidade de inibir mais de 45 estirpes de Bt e, também, algumas espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Em virtude desse potencial biotecnológico é importante realizar a correta identificação das estirpes de *B. thuringiensis*. As espécies de *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* são semelhantes morfológicamente entre si. Os três são bacilos Gram positivos (espessa camada de peptidoglicano) e aeróbios estritos (SNEATH; HOLT, 1986; DROBNIIEWSKI, 1993; SOBERÓN; BRAVO, 2010). Ambos possuem duas principais fases de crescimento: primeiramente ocorre o crescimento vegetativo, no qual estão com o metabolismo ativo e realizam a divisão binária. Quando a bactéria se encontra em condições críticas de sobrevivência (escassez de nutrientes e umidade) ela passa por sete estágios até se transformar em esporo e, assim, consegue sobreviver longos períodos nestas condições, isso ocorre geralmente quando está livre no meio ambiente. Os esporos voltam à vida vegetativa quando o meio propicia nutrientes e umidade suficientes, geralmente estas condições ficam favoráveis quando a bactéria infecta seus hospedeiros (RASI, 2010; SOBERÓN; BRAVO, 2010).

As três espécies de bacilos esporulam e crescem bem em meio ágar-chocolate e ágar-sangue de carneiro quando incubadas a 37 °C em meio aeróbico. Na microscopia de contraste de fase é possível identificar cristais protéicos laterais nos esporos dos *B. thuringiensis*, o que não se evidencia nos outros bacilos. Além disso, podem ser realizadas provas bioquímicas, observação do endósporo de cada espécie e outros testes para diferenciá-los possibilitando o isolamento do *B. thuringiensis* (KONEMAN et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar estirpes de *Bacillus thuringiensis* a partir de solos de cerrado com potencial de inibição de microrganismos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização morfológica de estirpes de *B. thuringiensis*;
- Identificar estirpes de *B. thuringiensis* produtoras de bacteriocinas;
- Avaliar a ação das bacteriocinas contra diferentes estirpes de *B. thuringiensis* e outros microrganismos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As estirpes de *B. thuringiensis* (*Bt*) são encontradas em todas as partes do mundo e já foram isoladas em diversos ecossistemas e em diferentes substratos como água, solo e insetos mortos. Em mais de 100 anos de história do *Bt* já foram identificadas mais de 40.000 estirpes (CÍCERO et al., 2009) demonstrando a variabilidade desta bactéria na natureza, permitindo o estudo detalhado de cada uma destas estirpes do bacilo.

Algumas estirpes de *B. thuringiensis* são caracterizadas por produzirem um peptídeo antimicrobiano conhecido como bacteriocina. De acordo com Schulz e colaboradores (2003) as classificações das bacteriocinas de bactérias ácidoláticas investigadas até o momento diferem em seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. Entretanto, a maioria delas possui baixa massa molecular (3 a 10 kDa), alto ponto isoelétrico, e contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Klaenhammer (1993) propôs que, baseadas na sua estrutura primária, massa molecular, estabilidade ao calor e organização

molecular as bacteriocinas de bactérias ácido-láticas podem ser subdivididas em quatro grupos:

Classe I - lantibióticas, caracterizadas pela presença de lantionina e b-metil lantionina;

Classe II - pequenas (<10 kDa) e relativamente estáveis ao calor, são peptídeos de membrana ativa que não contêm lantionina, subdivididos em:

(a) peptídeos ativos contra *Listeria*, com seqüência N-terminal definida (classe IIa);

(b) complexos, que requerem dois diferentes peptídeos para que tenham atividade (classe IIb);

(c) e peptídeos com tiol ativado, que requerem resíduos de cisteína reduzidos para que sejam ativos (classe IIc);

Classe III - grandes (>30 kDa), proteínas termolábeis e;

Classe IV - bacteriocinas complexas que contêm porções lipídicas ou de carboidratos além da porção protéica.

Em relação às inúmeras características dessa bactéria, muito se tem discutido a respeito da aplicação de bacteriocinas provenientes de *B. thuringiensis* na produção alimentícia. As bacteriocinas são peptídeos termoestáveis que possuem atividade tóxica contra outras bactérias para qual a bactéria possui imunidade específica (COTTER *et al.*, 2005). Elas são sintetizadas nos ribossomos e produzem poros nas células alvo, interferindo no potencial de membrana, ocasionando lise celular (OSCÁRIS; PISABARRO, 2000).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas são as mais abundantes e diversificadas, elas são similares a peptídeos microbianos produzidos por eucariotos, são geralmente catiônicos, anfipáticos, responsáveis pelo aumento da permeabilidade de membrana e variam de 2 a 6 kDa (HENG *et al.*, 2007). Este peptídeo pode atuar no controle biológico de microrganismos, suprimindo a ação desses. Portanto, existe uma expectativa de diminuição da incidência de doenças transmitidas pela ingestão de alimentos contaminados. Dessa forma, as bacteriocinas podem ser utilizadas como uma importante ferramenta de biocontrole, pois elas são em geral, uma das opções em um mosaico de possíveis mecanismos para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos (SOARES, 2013).

Muitos estudos já foram realizados para conseguir identificar os diferentes tipos de bacteriocinas que *B. thuringiensis* é capaz de sintetizar. Segundo Salazar-Marroquín (2016) dentre as bacteriocinas já identificadas cinco apresentaram potencial de inibição. A maior

parte dessas é de amplo espectro e inibe várias espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estudos realizados confirmam que cada bacteriocina atua contra microrganismos específicos (FUENTE-SALCIDO, 2012).

4. METODOLOGIA

Coleta das amostras - As coletas das amostras foram realizadas no período de setembro a novembro de 2017 no Distrito Federal. Para a obtenção de isolados de *B. thuringiensis* foram processadas nove amostras de solo, oriundas do parque da cidade, das margens do lago Paranoá na região sul e da zona central de Brasília. As estirpes foram coletadas próximas a raízes de árvores e plantas.

Isolamento das Estirpes - Foram coletadas amostras de solo do cerrado do Distrito Federal e, cada amostra, continha 1 g de solo, que foi homogeneizada por turbilhamento em 9 mL de solução salina 0,8%. Em seguida, uma alíquota de 1 mL desse material foi transferida para um tubo de microcentrífuga e incubada a 80 °C durante 12 min (POLANCZYK *et al.*, 2004). Ao final, os tubos foram resfriados rapidamente em banho de água-gelo (4 °C) durante 5 minutos.

Foram realizadas diluições de 10 e 100 vezes da amostra que sofreu o choque térmico, em solução salina 0,8%. Com um micropipetador foi retirada uma alíquota de 100 µL da diluição de 100 vezes para distribuição em uma placa de Petri contendo ágar LB (Tryptona 1 g, Extrato de Levedura 0,5 g, NaCl 1 g, Ágar 20 g, pH 7,2 e água destilada q.s.p 1000 mL) com penicilina G, 100 mg/mL (YOUSTEN *et al.*, 1984). O material recém preparado foi mantido em uma estufa por um período de 48 h a 28 °C (MONNERAT *et al.*, 2007).

Caracterização morfológica - As colônias bacterianas obtidas foram avaliadas quanto à sua morfologia para a seleção específica de *B. thuringiensis*.

Coloração de Gram - Após 48 horas de incubação, foi feito um esfregaço de cada uma das colônias. As lâminas contendo as bactérias para identificação foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa. A lâmina foi submetida por passagem de 3 a 4 vezes pela chama do bico de Bunsen e, caso necessário, utilizou-se o álcool metílico, visando fixar o material. Em seguida, as lâminas foram cobertas com a solução de cristal de violeta (2

g de cristal de violeta, 20 mL de etanol a 95%, 0,8 g de oxalato de amônio, 80 mL de água destilada) durante 1 minuto. Ao final, a lâmina foi lavada com água destilada. O esfregaço foi coberto com solução de iodeto de Gram (1 g de iodo, 2 g de iodeto de potássio, 300 mL de água destilada) por 1 minuto seguido por lavagem com água destilada.

Após a coloração, a lâmina foi descorada com acetona/álcool na proporção de 80:20 até que a cor violeta desaparecesse. Em seguida, a lâmina foi lavada com água novamente e adicionou-se o contracorante safranina (safranina 2,5% em etanol 95%) por um minuto. A lâmina foi lavada com água corrente e seca em temperatura ambiente. Depois de corada as células bacterianas estas foram visualizadas no microscópio óptico na objetiva de 100X (KONEMAN et al., 2008).

Coloração de coomassie - Após a seleção dos *Bacillus* foi feita a seleção da espécie *B. thuringiensis*. Esta coloração possibilitou a observação dos cristais protéicos de *B. thuringiensis*. Para isso foi preparado um esfregaço da colônia e a lâmina foi fixada pelo calor do bico de Bunsen. Em seguida, a lâmina foi coberta com a solução de coomassie blue (0,1% de Coomassie Blue G-250, 25% de Metanol e 5% de Ácido Acético) por 10 minutos. O esfregaço foi lavado com água destilada, seco em temperatura ambiente e as células visualizadas no microscópio óptico na objetiva de 100X com a utilização do óleo de imersão (KONEMAN et al., 2008).

Cultivo de *Bacillus thuringiensis* - Após a identificação, as colônias foram isoladas e mantidas em ágar LB durante o desenvolvimento da pesquisa, em uma estufa a 28 °C. O armazenamento foi feito mantendo-se as placas crescidas com as bactérias a 4 °C até o momento do uso.

Teste de confronto em placa – Para a realização do teste de confronto em placa foram preparadas placas de meio LB sólido. Após a solidificação do meio, foi feita uma estria com alça estéril descartável de aproximadamente 4 cm de comprimento. A uma distância de 1 cm foi feita outra estria nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram realizados confrontos da estirpe Bac e P4 contra todas as outras estirpes (B01, B02, B03, B04, B05, B06 e B07) e de Bac contra algumas bactérias patogênicas (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e

Proteus sp.) Após 48 h de incubação em estufa a 28 °C foram feitas as medições das distâncias entre as estirpes.

Cinética e avaliação da atividade de bacteriocinas - Após a seleção da estirpe de *B. thuringiensis* com maior potencial de produção de bacteriocina esta foi inoculada em vários frascos de 50 ml contendo 15 mL de meio LB e mantidas a 28 °C por 24 horas sob agitação.

Na sequência foram coletados os conteúdos dos frascos em intervalos de 2 h até a estirpe atingir a fase exponencial de crescimento (16 a 20 h de crescimento). Em seguida, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 7500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membranas Millex-GV de 0,22 µm (Millipore S.A., St Quentin-en-Yvelines) e mantidos a -20 °C até o momento do uso.

Alíquotas de 100 µL de cada tempo de coleta foram aplicadas em poços de 1 cm de diâmetro que foram feitos previamente em meio LB ágar e previamente semeadas por toda a superfície da placa de forma homogênea com a bactéria indicadora (por exemplo, outra estirpe de *B. thuringiensis* que tenha sido isolada e crescida em meio sólido por 24 h a 28 °C) utilizando-se um swab. Após incubação a 28 °C durante 24 horas, os meios foram analisados tomando-se três medidas de cada um dos halos de inibição que foram observados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das nove amostras coletadas nos diversos pontos da cidade foi possível selecionar, pelo menos, uma estirpe de *B. thuringiensis* de cada local de coleta. As estirpes receberam as denominações de Bac, P4, B01, B02, B03, B04, B05, B06 e B07.

Em seguida, realizou-se a caracterização morfológica por meio das colorações de Gram e Coomassie. Observou-se que das nove estirpes identificadas por microscopia todas apresentaram a forma bacilar e a coloração de Gram indicou que os bacilos eram Gram positivos. O próximo passo foi a detecção do cristal proteico, característico de *B. thuringiensis*, por meio da coloração de Coomassie. Nessa coloração foi possível identificar o cristal proteico corado de azul próximo ao esporo.

A aplicação das duas técnicas de coloração associada à microscopia permitiu identificar a forma bacilar da célula vegetativa e o esporo (Figura 1) sugerindo que as estirpes pertencessem à espécie *B. thuringiensis*. A exclusão das outras duas espécies de *Bacillus* (*B.*

cereus e *B. anthracis*) é possível na fase anterior à coloração pois o choque térmico que é aplicado na fase de isolamento das estirpes é capaz de eliminar essas duas espécies de *Bacillus*).

Reforça-se, aqui, que as bacteriocinas são secretadas para o meio de cultura e, dessa forma, não são visualizadas nas colorações ou na microscopia.

B. thuringiensis pode ser encontrado de duas formas: germinativa ou na forma de esporo. O processo de esporulação ocorre para a proteção da bactéria em ambientes desfavoráveis para o seu crescimento. Em ambientes com nutrientes e água suficientes para o seu desenvolvimento ocorre a germinação, essas duas fases do Bt podem ser observadas na figura 1 (SCHÜNEMANN, 2014).

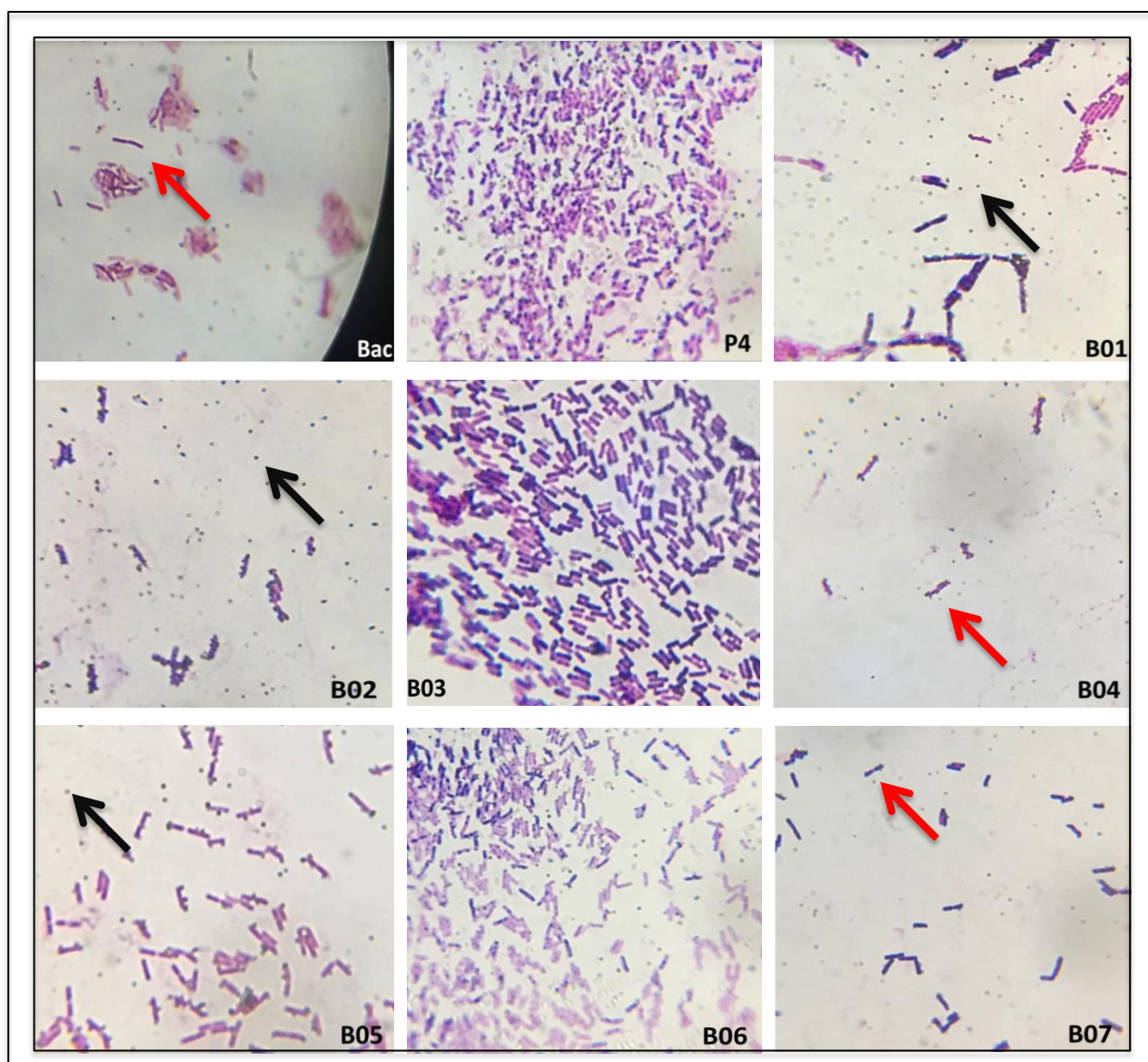


Figura 1: Coloração de Gram das nove estirpes isoladas de *Bt*. Todas as estirpes foram identificadas como Bacilos Gram positivos, como pode ser observado na indicação da seta vermelha. A seta preta indica os esporos de *Bt*.

O Distrito Federal é considerado como parte do cerrado Brasileiro. Esse bioma é caracterizado por possuir um solo pobre em nutrientes e uma vegetação baixa, apresentando um inverno seco e um verão chuvoso. O clima é conhecido como tropical sazonal e possui temperatura variando de 21 °C a 27 °C, temperatura ideal para o crescimento de *Bt* (LIMA, 2001; BRASIL, 2009).

Após a confirmação do isolamento das estirpes de *Bt* foi realizado um bioensaio de confronto por estrias para verificar o potencial de inibição microbiana de cada uma das estirpes isoladas conforme observado nas figuras 2 e 3. O ensaio foi mantido a 28 °C por 24 h a 72 h e, após o tempo determinado, foi possível observar o potencial de produção de bacteriocina de cada estirpe e selecionar a melhor estirpe de *Bt* quanto à capacidade de inibição. As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas secretadas que tem potencial inibitório. Isso faz com que a estirpe mais sensível cresça afastada da estirpe produtora de bacteriocina. Além disso, elas são produzidas por diferentes grupos de bactérias (CHERIF et al., 2001). A estirpe que apresentou um melhor potencial de inibição no bioensaio foi a Bac, como observado na figura 2. Apesar do potencial da Bac inibir as outras estirpes de *Bt* ela não foi capaz de inibir microrganismos patogênicos.

As bacteriocinas produzidas por *Bt* são conhecidas por inibirem o crescimento de bactérias patogênicas e os produtos desenvolvidos com elas são utilizados há mais de 50 anos e trazem inúmeros benefícios para a saúde pública (MONNERAT e BRAVO, 2000; CÁRDENAS et al., 2001). A identificação das estirpes de *Bt* é importante para a classificação dos tipos de bacteriocinas que cada uma produz, pois, cada classe é responsável pela inibição de microrganismos diferentes e o modo de inibição delas é diferente (MONNERAT e BRAVO, 2000; RASI, 2010).

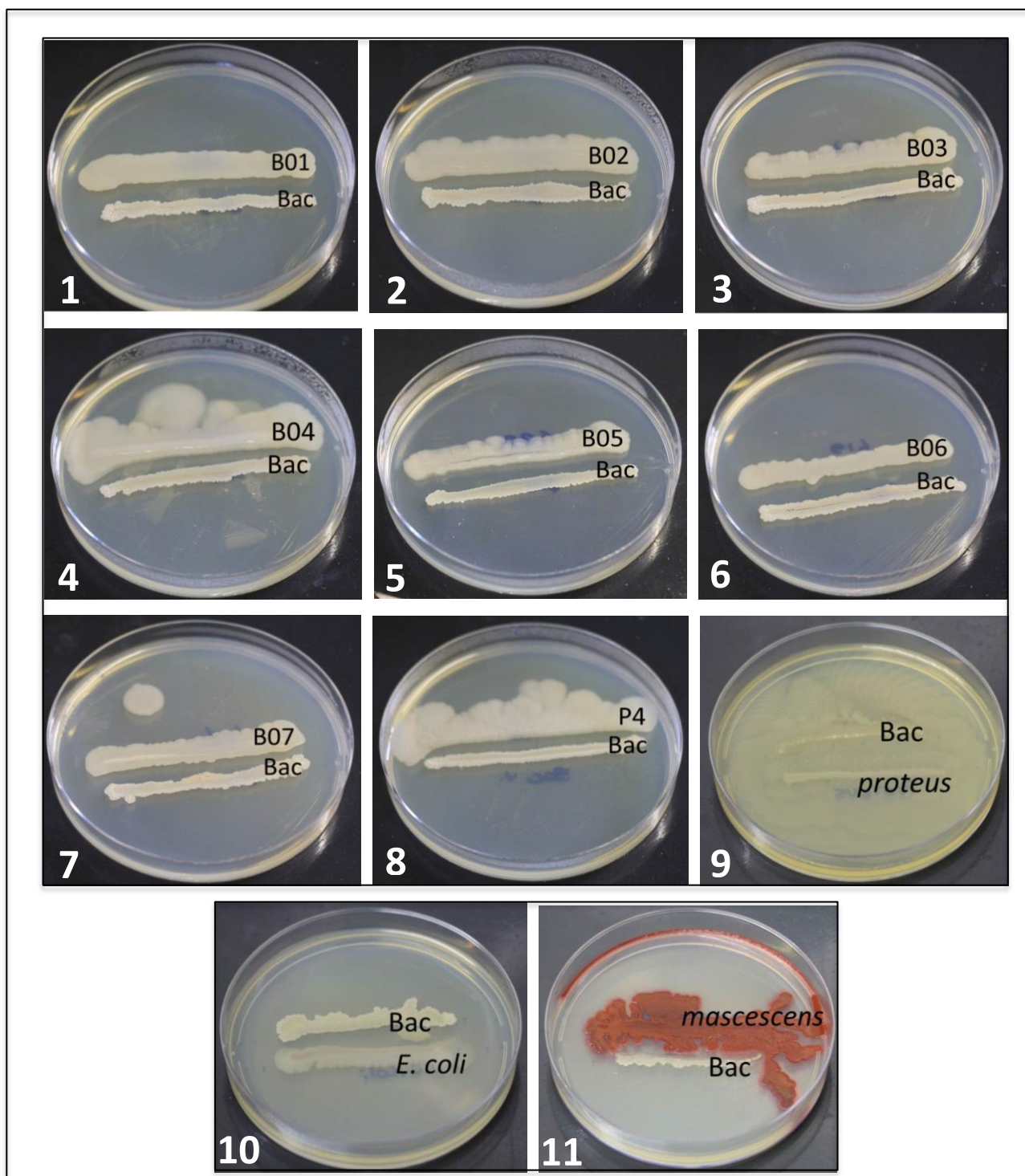


Figura 2: Ensaio de confronto entre Bac e as outras estirpes isoladas de Bt. Os números de 1 a 8 são os confrontos em estria da estirpe Bac contra as outras estirpes de Bt. Observa-se que as estirpes cresceram em sentido oposto em relação à estirpe Bac. De 9 a 11 são confrontos da estirpe Bac contra três bactérias patogênicas. Em 9, *Proteus* sp cresceu por cima da estirpe Bac. Em 10, o teste contra *E. coli* não gerou um resultado conclusivo de inibição. Em 11, *S. marcescens* cresceu ao redor da estirpe Bac.

A distância que as estirpes se mantiveram uma das outras no bioensaio de estrias indica o potencial inibitório das estirpes de Bt. Nesse bioensaio observou-se que o maior potencial de inibição foi demonstrado pela estirpe Bac contra todas as outras estirpes de Bt, como pode ser observado na tabela 1. Os resultados indicaram que as distâncias variaram de 3 a 7 mm, mostrando que cada estirpe pode ser inibida com um potencial diferente. O confronto realizado com as bactérias patogênicas *Proteus sp.* e *Serratia marcescens* indicaram que não houve a inibição e a razão para isso pode ser o tipo de bacteriocina que a Bac produziu (FUENTE-SALCIDO, 2012). No confronto com a *Escherichia coli* o resultado foi inconclusivo, pois não houve contato entre ela e a Bac; porém, *E. coli* não cresceu contra a Bac, deixando o resultado inconclusivo.

Tabela 1: Medida da distância das estrias que foram produzidas nos bioensaios entre a estirpe Bac e outras estirpes de Bt e com as bactérias patogênicas.

| Estirpes | Distância das estrias |
|---|------------------------------|
| Bac x B01 | 6 mm |
| Bac x B02 | 3 mm |
| Bac x B03 | 5 mm |
| Bac x B04 | 4 mm |
| Bac x B05 | 6 mm |
| Bac x B06 | 7 mm |
| Bac x B07 | 3 mm |
| Bac x P4 | 3 mm |
| Bac x <i>Proteus sp</i> | 0 mm |
| Bac x <i>Escherichia coli</i> | 5 mm |
| Bac x <i>Serratia marcescens</i> | 0 mm |

Comparada com as demais estirpes de Bt que foram isoladas, a estirpe P4 não apresentou potencial de inibição contra nenhuma outra estirpe testada no confronto, indicando que não houve a produção de bacteriocina, como mostrado na figura 3. No teste da estirpe P4 contra as demais estirpes houve contato das duas bactérias testadas, demonstrando a falha na inibição.

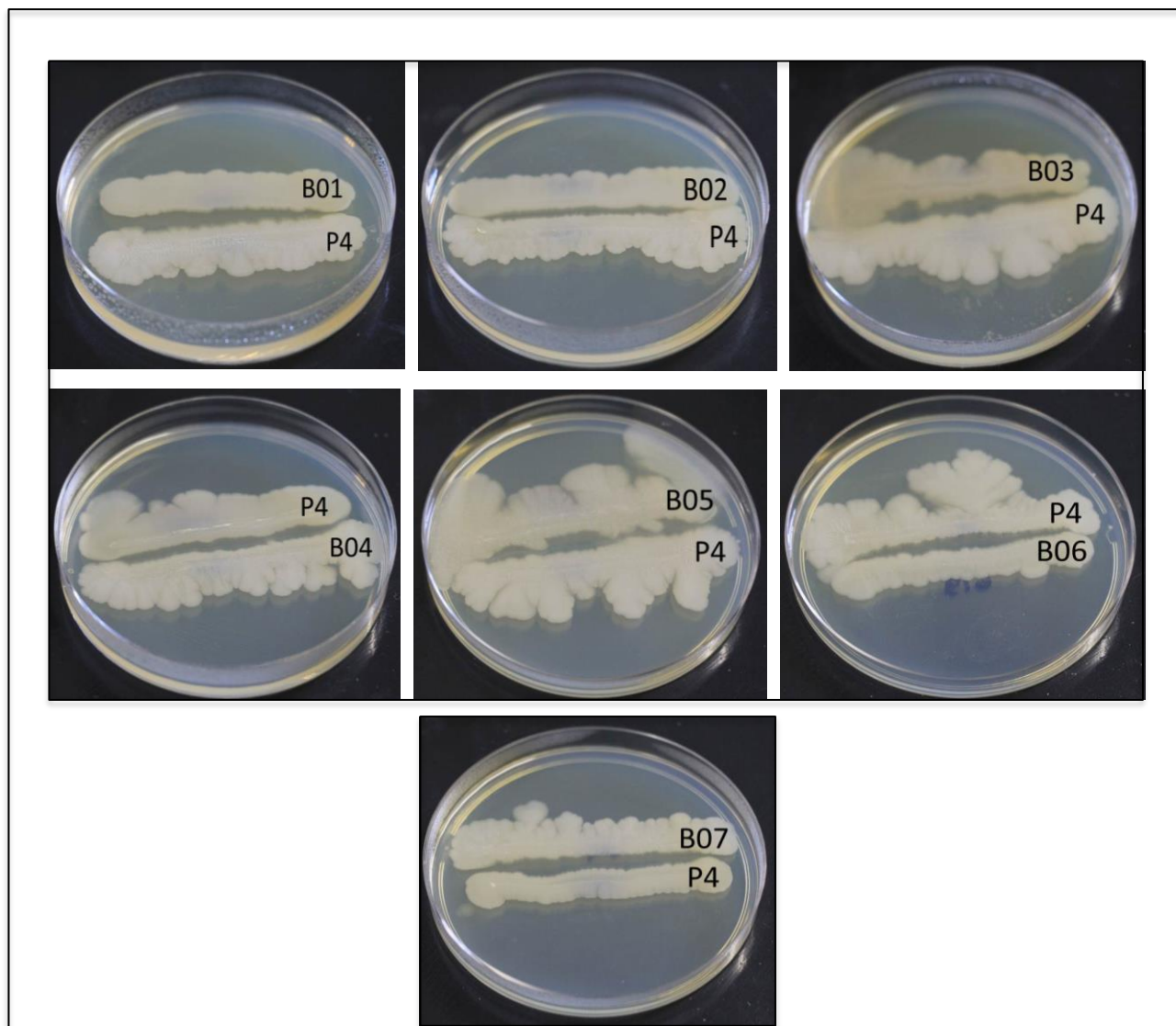


Figura 3: Ensaio de confronto entre a estirpe P4 e as outras estirpes de Bt. O único efeito de inibição produzido pela estirpe P4 foi no confronto contra a estirpe B07.

Após o bioensaio de confronto por estria foi selecionada a estirpe com maior potencial de inibição (Bac) e ela foi utilizada no bioensaio Well Diffusion, ensaio que foi mantido a 28 °C por 24 h e depois foi observada a formação do halo, que indica melhor o potencial de inibição, como demonstrado na figura 5. O método utilizado não é muito eficaz, pois a padronização do halo é difícil de ser realizada, porém esse ainda é considerado o melhor método para a visualização da produção de bacteriocina.

A estirpe Bac inibiu as estirpes B01, B02, B04, B06 e P4. Dentre essas estirpes que foram inibidas, o maior halo de inibição foi observado no bioensaio contra B02 e B06 (Figura 4).

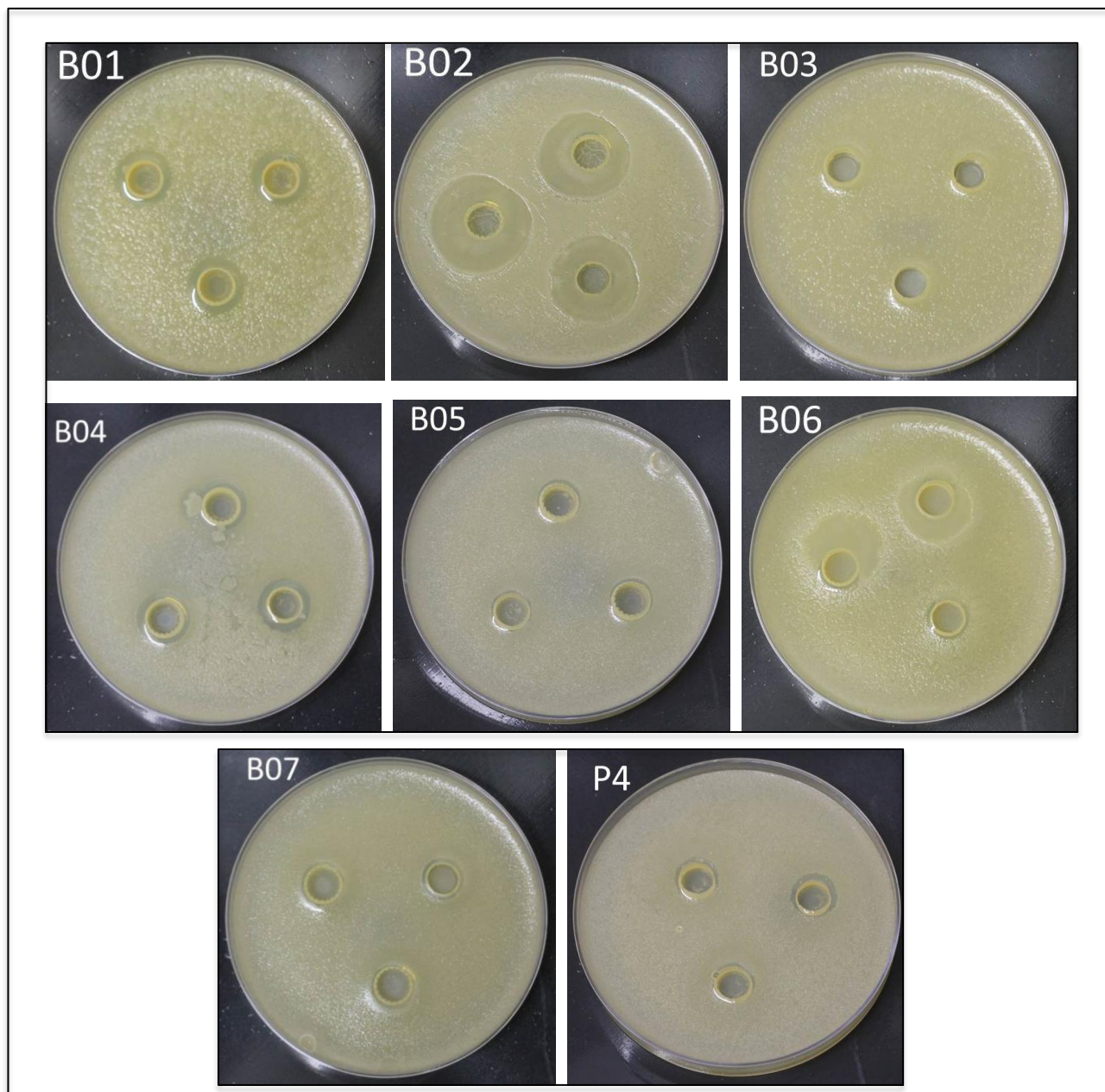


Figura 4: Ensaio de confronto entre Bac e as outras estirpes de Bt. Observa-se o halo de inibição nos confrontos contra as estirpes B01, B02, B04, B06 e P4. Os maiores halos de inibição foram observados nos confrontos utilizando-se as estirpes B02 e B06.

Tabela 2: Medida dos halos formados no bioensaio well diffusion de Bac contra as outras estirpes.

| Estirpes | Tamanho dos Halos |
|-----------------|--------------------------|
| B01 | 4 mm |
| B02 | 14 mm |
| B03 | Sem halo |
| B04 | 6,5 mm |
| B05 | 2,5 mm |
| B06 | 1,5 mm |
| B07 | 3 mm |
| P4 | 2,5 mm |

Observou-se que a estirpe B02 foi a que sofreu a maior inibição, seguida da estirpe B04. No confronto contra a estirpe B03 não foi possível visualizar halo de inibição. Para as demais estirpes os halos de inibição variaram de 1,5 mm a 4 mm.

Para confirmar a produção de bacteriocina foi realizada uma cinética de crescimento durante 48 horas, com coletas realizadas de 2 em 2 horas. Esse ensaio possibilita a visualização das quatro fases do crescimento bacteriano, com a formação de um gráfico que mostra a quantidade de bactéria em função do tempo (TORTORA, 2017), ou seja, indica o momento de produção da bacteriocina como pode ser visualizado no gráfico 1.

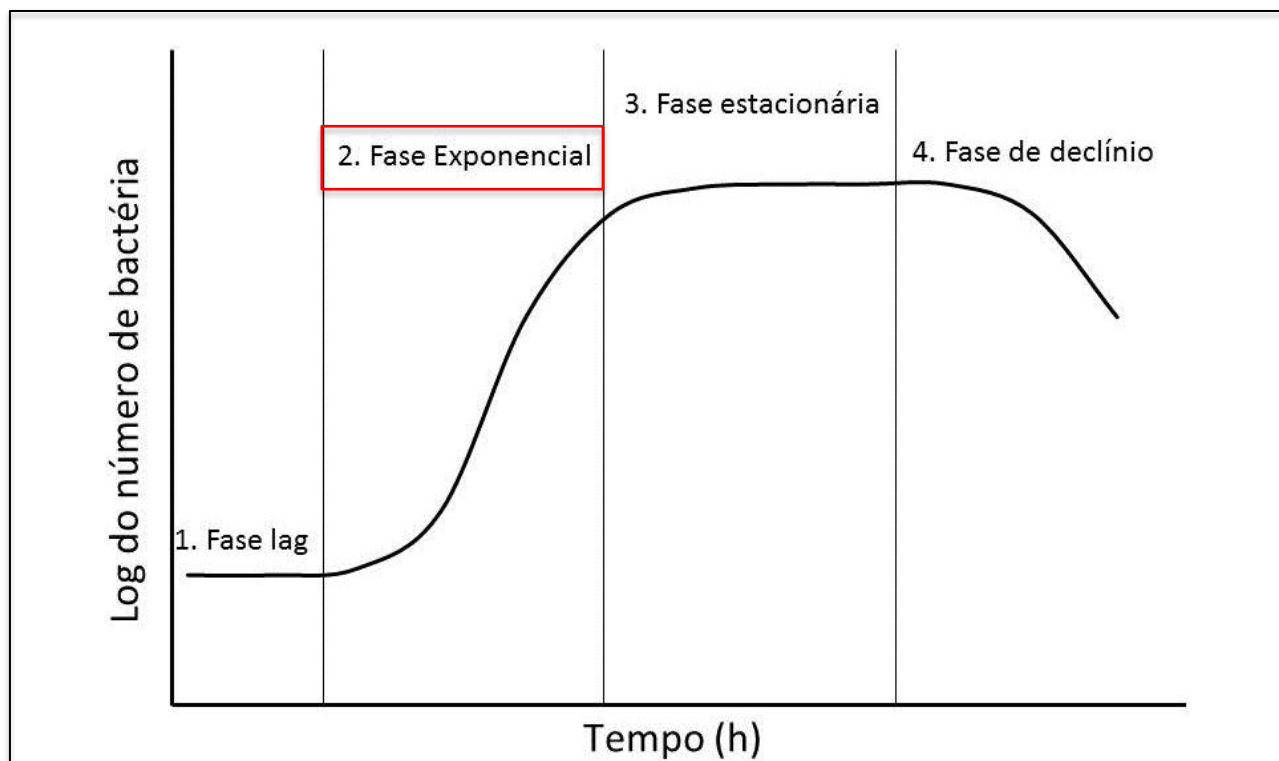


Gráfico 1: Gráfico mostrando as fases do crescimento bacteriano. O destaque em vermelho indica a fase onde ocorre a produção da bacteriocina em *B. thuringiensis*.

A fase 1 denominada como lag indica o início do crescimento, na qual a bactéria está se adaptando ao meio e quase não ocorre divisão, elas estão se preparando para iniciar a multiplicação. Na fase 2, também conhecida como fase exponencial as bactérias começam a se dividir e ocorre um aumento logarítmico, essa é a fase de maior atividade metabólica e a que geralmente ocorre a maior produção de bacteriocina. A fase 3 ou fase estacionária elas começam a se estabilizar e param de se reproduzir, por isso no gráfico essa fase é indicada como uma reta, pois a divisão está diminuindo cada vez mais. Por fim a fase 4 é a fase de declínio, onde começa a ocorrer a morte celular e o número de bactérias viáveis cai levando a divisão ao zero (MURRAY et al. 2004; TORTORA, 2017).

Cada tipo de bacteriocina é produzida em períodos diferentes da fase de crescimento bacteriano. Os resultados obtidos nesse trabalho indicaram que a produção começou com 4 horas de crescimento e foi aumentando até o seu ápice entre 8 e 10 horas de crescimento, após esse período a produção começou a cair e o halo pode ser visto com um tamanho menor. Esses resultados indicam que a produção da bacteriocina ocorreu na fase exponencial e começou a diminuir no meio da fase estacionária. A produção das bacteriocinas de *B.*

thuringiensis varia do final da fase log até o meio da fase estacionária (RASI, 2010). A queda da produção pode estar associada ao início da esporulação, pois esse processo é caracterizado pela queda de atividade do composto.

Na cinética de crescimento a estirpe Bac foi inoculada em meio LB líquido, esse meio foi então mantido por 24 h em agitação. As coletas foram realizadas nos intervalos de 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 12 h, ressaltando-se que entre as coletas a cultura continuou em agitação. Com as amostras coletadas nos intervalos de tempo determinados foi realizado outro ensaio well diffusion, com a B06 semeada na placa e as amostras dos sobrenadantes distribuídas nos pocinhos da placa. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 72 h. Os resultados indicaram que houve a formação de halo em todos os períodos da coleta e eles variaram de tamanho em cada coleta, como pode ser observado na figura 5.

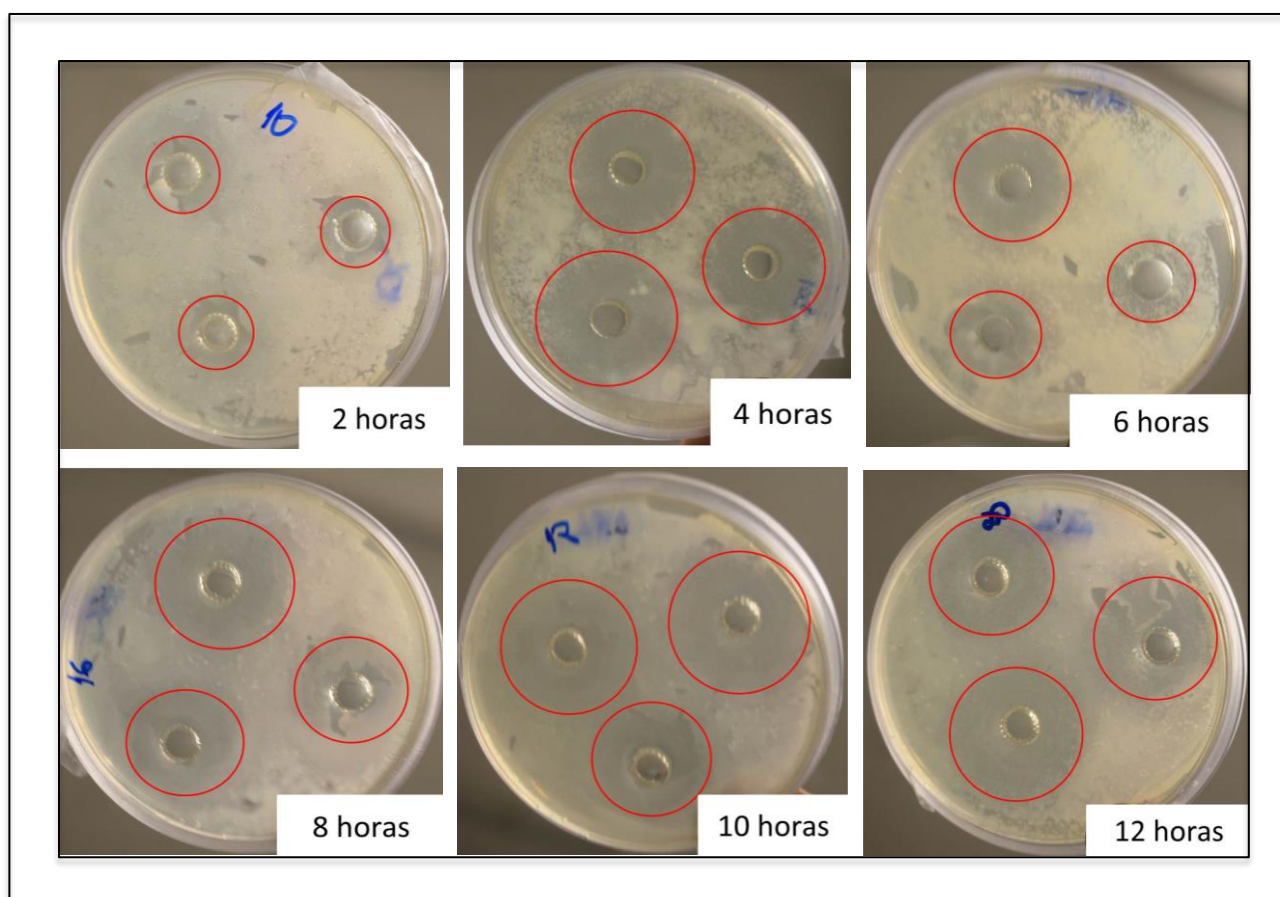


Figura 5: Ensaio de confronto do sobrenadante da Bac contra B06. Visualização dos halos após 24 horas da inoculação da placa. Os círculos em vermelho indicam o tamanho dos halos.

Tabela 3: Medida do halo formado no ensaio de cinética de crescimento, com medidas após 24 h do crescimento.

| Hora da coleta | Tamanho dos Halos |
|----------------|-------------------|
| 2 horas | 2 mm |
| 4 horas | 10 mm |
| 6 horas | 10 mm |
| 8 horas | 15 mm |
| 10 horas | 15 mm |
| 12 horas | 13 mm |

Observou-se que os halos eram bem visíveis e delimitados após 24 h da adição do sobrenadante onde cresceu a estirpe Bac. Dos demais tempos de observação, os halos desapareceram, indicando um efeito restrito da bacteriocina produzida pela estirpe Bac no crescimento da estirpe B06. Esse tipo de efeito é consistente com o efeito bacteriostático que é relatado para algumas bacteriocinas. Esse efeito é caracterizado por causar uma inibição no crescimento de outras bactérias, sem causar a morte da célula bacteriana. Além desse efeito, Bt também é conhecido por possuir ação bacteriolítica, ou seja, capacidade de matar outras bactérias e eliminá-las (MURRAY, 2016).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do trabalho puderam indicar que existe a produção de bacteriocina por uma estirpe de Bt, porém novas metodologias devem ser utilizadas para poder identificar o tipo de bacteriocina que está sendo produzida e para verificar a ação das mesmas contra microrganismos patogênicos. A não formação dos halos em alguns experimentos pode ser justificada pelos possíveis erros que o método está sujeito, por fatores externos ocorridos durante as práticas ou pela natureza bacteriostática da bacteriocina.

Os resultados indicaram o grande potencial biotecnológico que *B. thuringiensis* apresenta, mostrando que suas bacteriocinas apresentam potencial de inibição contra algumas estirpes que foram isoladas. Portanto, o isolamento de Bt é importante para a descoberta de novas estirpes que tenham um melhor potencial para o uso biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWDISH, D.M., DAVIDSON, D.J. Hancock RE (2005) **A re-evaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity**. *Curr Protein Pept Sci* 6: 35-51.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado – PPCerrado. Set, 2009.

CÁRDENAS, M. I. et al. Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. *Ciencias Uanl*. v. 4, p. 51-62, 2001.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; SLAMA, K.B.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. **Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil**. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, n. 4, 2001.

CÍCERO, E.A.S.; FERRUDO, A.S.; LEMOS, M.V.F. 2009. Identificação de genes CRY de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Sphenophorus Levis*, o bicudo da Cana-de-Açúcar. **Rev. Bragantina**, v. 68, n. 4, p. 817 – 823.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.R. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Rev Microbiol**, v. 3, p. 777-788.

DROBNIOWSKI, F.A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. **Clin Microbiol Rev.**, v. 6, n. 4, p. 324–338.

FUENTE-SALCIDO, N.M.L.; BARBOZA-CORONA, J.A.; MONZÓN A.N.E.; CANO, R.D.P.; BALAGURUSAMY, N.; BIDESHI, D.K.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R. Expanding the Use of a Fluorogenic Method to Determine Activity and Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Bacteriocins Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *The Scientific World Journal*. v. 2012, 2012.

HENG, N.C.; BURTENSHAW, G.A.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. 2007. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 7763–7766.
KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, 1993.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; WASHINGTON, C.W. **Diagnóstico Microbiológico**. Editora Médica e Científica, 6ª Ed., Rio de Janeiro, p. 1565, 2008.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos**. v. 3, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

MONNERAT, R. G. *et al.* Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 4ª edição, Rio de Janeiro: Editora: Guanabara Koogan S. A., 2004.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8ª edição, Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016.

OSCÁRIZ, J.C.; PISABARRO A.G. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 361-369, 2000.

POLANCZYK, R.A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda*** (J. E. Smith). 144 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociencia**, v. 7, p. 1-10, 2003.

RASI, G.C. **Estudo de atividade de peptídeos tipo de bacteriocina de *Bacillus thuringiensis***. UnB – Instituto de Biologia – Pós-graduação em Biologia Molecular. Abril, 2010.

SALAZAR-MARROQUÍN E.L.; GALÁN-WONG L.J.; MORENO-MEDINA V.R.; REYES-LÓPEZ M.Á.; PEREYRA-ALFÉREZ B. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications. *Reviews in Medical Microbiology*. v. 27, n. 3, p 95-101, 2016.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alim. Nutr**, v. 14, n. 2, p. 229-235, 2003.

SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M.; **Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture**. ISRN Microbiology, vol. 2014, 2014.

SILVA, N. da. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae***. 40 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (eds.). 1986. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p. 1105.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. ***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas inseticidas**. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.I. **Microbiologia**. v. 12, Porto Alegre: ArtMed, 2017.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, V. 3, p. 315 – 343, 1984.