



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE – FACES  
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**ANA CAROLINA HORTENCIO GARCIA  
VANESSA IRIS DE MEDEIROS SANTOS**

**SELEÇÃO DE ATIVOS BIOLÓGICOS DE *Bacillus thuringiensis* COM  
POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS**

**BRASÍLIA-DF  
2016**



**ANA CAROLINA HORTENCIO GARCIA  
VANESSA IRIS DE MEDEIROS SANTOS**

**SELEÇÃO DE ATIVOS BIOLÓGICOS DE *Bacillus thuringiensis* COM  
POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e  
Pesquisa pela Faculdade de Ciências da  
Educação e da Saúde – FACES

Orientação: Paulo Roberto Queiroz

**BRASÍLIA-DF  
2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Pela realização deste, agradecemos ao nosso orientador Dr. Paulo Roberto Queiroz, pela oportunidade única de desenvolvimento da pesquisa e pela confiança depositada. Agradecemos uma a outra pela parceria de sucesso e o apoio durante essa jornada. A nossa amiga colaboradora Nathalia Belchior e a todos os colegas do Labocien do UniCEUB que sempre nos socorreram e proporcionaram a infraestrutura para realização dos ensaios laboratoriais, sem essa equipe por trás de tudo não teríamos resultados para apresentar, esse trabalho, sem dúvidas, também é mérito de vocês.

## RESUMO

*Bacillus thuringiensis* é um bacilo Gram-positivo comumente encontrado em solo. Por ser produtor de substâncias antimicrobianas é uma promissora ferramenta de biocontrole de diferentes espécies de insetos e microrganismos que estão relacionados a patologias humanas. Sua toxicidade advém de cristais proteicos produzidos durante a esporulação conhecidos como cristais Cry e proteínas que são produzidas na fase de esporulação, as bacteriocinas, que possuem propriedades bacteriolítica e bacteriostática. O objetivo desse projeto foi isolar estirpes de *B. thuringiensis* a partir de solos de cerrado com potencial de inibição de microrganismos. Foram isoladas e caracterizadas morfologicamente nove estirpes de Bt (P4, BAC, ACVI1, ACVI2, ACVI3, ACVI4, ACVI5, ACVI6 e ACVI7), com as quais foram realizadas bioensaios de confronto, em que foi verificado o potencial de inibição de cada estirpe. As estirpes ACVI5, ACVI6 e BAC se destacaram como as principais inibidoras. A coloração de Gram foi utilizada para confirmação da caracterização morfológica e o uso de corante Amido Black permitiu a visualização das toxinas do bacilo em microscopia óptica, confirmando a identificação de Bt. Os ensaios de inibição demonstraram que a estirpe P4 foi a que apresentou o menor potencial de produção de bacteriocinas, sendo inibida por todas as demais estirpes isoladas. Esse projeto de pesquisa com *B. thuringiensis* vem sendo realizado no Centro Universitário de Brasília há 5 anos com o intuito de se avaliar o potencial biotecnológico de uso futuro dessa bactéria em inibir microrganismos de interesse biomédico. O Brasil é um país que apresenta alta incidência de doenças provocadas por microrganismos e a necessidade de desenvolver técnicas para combater tais doenças é decisiva. Nesse contexto o uso de *B. thuringiensis* é uma alternativa vantajosa, visto ser de isolamento simples, seus produtos tóxicos a organismos específicos e oferecer baixo risco ambiental e à saúde humana.

**Palavras-chave:** Bacteriocinas. Biocontrole. Inibição.

**I. Sumário**

RESUMO.....	2
II. INTRODUÇÃO .....	4
III. OBJETIVOS .....	5
IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
V. METODOLOGIA.....	7
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	6

## II. INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta em 1901, *Bacillus thuringiensis* tem demonstrado grande importância no controle de várias espécies de insetos e microrganismos que estão intimamente relacionados com patologias humanas (POLANCZYK, 2003).

A grande variedade de *B. thuringiensis* possibilita a existência de uma ou mais estirpes capazes de produzir uma ou mais toxinas contra um determinado microrganismo. Por isso, este bacilo deve ser amplamente estudado, já que foram identificadas mais de 40.000 estirpes (SCHULZ et al., 2005).

Dentro desse contexto, algumas estirpes de *B. thuringiensis* tem como potencial a capacidade de produzir agentes antimicrobianos. As bacteriocinas caracterizam-se como peptídeos inibidores de crescimento bacteriano, em função de sua propriedade bacteriolítica e bacteriostática contra a célula-alvo. Evidências apontam sua ação na preservação de alimentos e no combate a infecções bacterianas (SCHULZ et al., 2005).

Vale acrescentar a esse contexto que o Brasil é um país que possui como característica uma alta incidência de doenças provocadas por microrganismos. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de técnicas eficazes que possam diminuir a incidência destas doenças. O controle do crescimento de microrganismos por meio de bacteriocinas produzidas por *B. thuringiensis* é uma alternativa importante para a diminuição da incidência destas doenças, pois o bacilo é de isolamento simples, seus produtos são especificamente tóxicos a alguns microrganismos e, dessa forma, seu impacto ambiental e humano são menores (ANGELO et al., 2010).

As atividades com *B. thuringiensis* vem sendo realizadas no UniCEUB (Centro Universitário de Brasília) há 5 anos e várias características de *B. thuringiensis* já foram estudadas e o presente trabalho visa dar continuidade aos resultados de isolamento de *B. thuringiensis* com a intenção de se avaliar o potencial biotecnológico dessa bactéria em inibir microrganismos de interesse biomédico.

### III. OBJETIVOS

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

Realizar a caracterização morfológica de estirpes de *B. thuringiensis*;

Identificar estirpes de *B. thuringiensis* produtoras de bacteriocinas.

### IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

*Bacillus thuringiensis* é uma espécie de eubactéria pertencente ao Filo Firmicutes, da Classe Firmibacteria, Ordem Eubacteriales, Família Bacillaceae do Gênero *Bacillus* (SNEATH et al., 1986; DROBNIEWSKI, 1993).

Este bacilo foi isolado pela primeira vez em 1901 a partir da fase larval do inseto *Bombyx mori* (mariposa), pertencente à Ordem Lepidoptera, no Japão. 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). Nestes 100 anos de história do *B. thuringiensis* 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 e sorotipos do bacilo.

De acordo com SCHULZ e colaboradores (2005) a classificação das bacteriocinas de bactérias ácido-láticas 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 4 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 proteica.

Em função das semelhanças observadas nas suas características, essa classificação acabou sendo adotada também para substâncias produzidas por outras bactérias Gram positivas.

Ainda 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, 2001).

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.

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 morfologicamente entre si. Os três são bacilos Gram positivos (espessa camada de peptidoglicano) e aeróbios estritos (SNEATH; HOLT, 1986; DROBNIOWSKI, 1993; SOBERÓN; BRAVO, 2010). 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 incubados a 37 °C em meio aeróbico. Na microscopia de contraste de fase é possível identificar cristais proteicos 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).

## V. METODOLOGIA

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

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 (Tripton 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/dL (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 a sua morfologia para a seleção específica de *B. thuringiensis*.

**Coloração de Gram** - Após as 48 h de incubação, foi feito um esfregaço de cada colônia que secou a temperatura ambiente. A lâmina passou de 3 a 4 vezes pela chama do bico de Bunsen para fixação do material. Em seguida, a lâmina teve sua superfície coberta 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 min. 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 min e logo após a lavagem com água destilada.

O esfregaço foi descorado com acetona: álcool (na proporção 80:20) até que a cor violeta desaparecesse. O esfregaço foi lavado com água corrente e secou em temperatura ambiente. A lâmina corada foi observada no microscópio óptico na objetiva de 100x.

**Cultivo de *Bacillus thuringiensis*** - Após a identificação, as colônias foram mantidas em ágar LB durante o desenvolvimento da pesquisa, em uma estufa a 28°C.

**Confirmação da presença das bacteriocinas** - Após as 48 h de incubação, foi feito um esfregaço de cada colônia que secou a temperatura ambiente. A lâmina passou de 3 a 4 vezes pela chama do bico de Bunsen para fixação do material. Em seguida, a lâmina teve sua superfície coberta com a solução de corante Amido Black por 1 min e logo após a lavagem com água destilada e secagem em temperatura ambiente. A lâmina corada foi observada no microscópio óptico na objetiva de 100x.

**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. Cada estria consistia de uma estirpe de *B. thuringiensis*. Após 72 h de incubação em estufa a 28 °C foram feitas as medições das distâncias entre as estirpes.

**Avaliação de atividade inibitória** - As estirpes de *B. thuringiensis* foram inoculadas em 50 mL de meio LB e mantidas a 28 °C por 16 h. As atividades das bacteriocinas foram avaliadas pelo teste de disco-difusão em ágar dispensando os discos de papel-filtro, impregnados com as bactérias produtoras de bacteriocinas sobre a placa previamente inoculada com uma cultura indicadora (uma outra estirpe

de *B. thuringiensis*). As placas de Petri contendo a cultura indicadora foram preparadas a partir da cultura de uma outra estirpe de *B. thuringiensis*, denominada P4, isolada e crescida em meio LB até a fase estacionária de crescimento, diluída na proporção de 1/10 em solução aquosa de peptona a 0,1%. A cultura diluída (500 µL) foi misturada a 4,5 mL de LB ágar semi sólido (0,75% de ágar) a 45 °C e vertida em placas contendo ágar LB. Após solidificação e secagem do ágar em câmara de fluxo horizontal durante 60 min, os meios foram incubados a 28 °C durante 2 h antes de sua utilização. Após incubação a 28 °C durante 72 h, os meios foram analisados quanto à formação de halos de inibição.

## VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase de isolamento de *B. thuringiensis* foram coletadas amostras de solo no Cerrado. Do total de amostras, 9 apresentaram crescimento, às quais foram denominadas como estirpes P4, BAC, ACVI1, ACVI2, ACVI3, ACVI4, ACVI5, ACVI6 e ACVI7. Destas, somente 2 estirpes (ACVI5 e BAC) apresentaram inibição positiva quando colocadas com as outras em uma mesma placa e posteriormente avaliadas pelo teste de disco de difusão, pois sabe-se que as estirpes de Bt são capazes de dar origem a toxinas eficientes no combate a outros microrganismos e suas toxinas apresentam efeitos sobre outras estirpes de *B. thuringiensis* (SCHULZ et al., 2005).

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva e aeróbica (KONEMAN, 2008). Assim sendo, para a confirmação morfológica das bactérias isoladas foi realizada a coloração de Gram como mostrado abaixo (figuras 1 a 9). Todas as bactérias foram submetidas a este procedimento. Observou-se que o resultado foi a identificação de bacilos Gram-positivos em todas as estirpes isoladas.

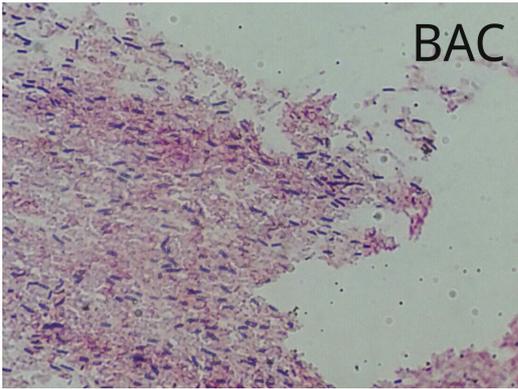


Figura 1: Estirpe BAC. Bacilo Gram Positivo.

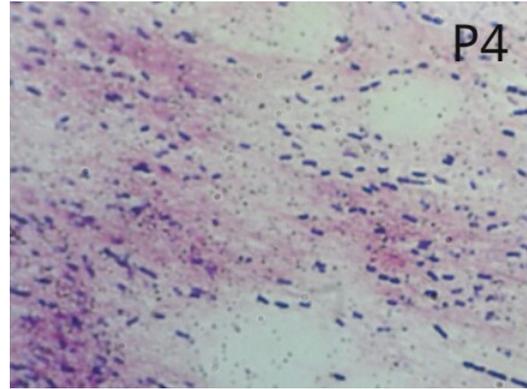


Figura 2: Estirpe P4. Bacilo Gram Positivo.

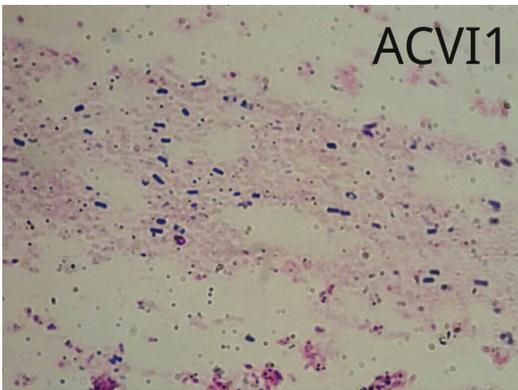


Figura 3: Estirpe ACVI. Bacilo Gram Positivo.

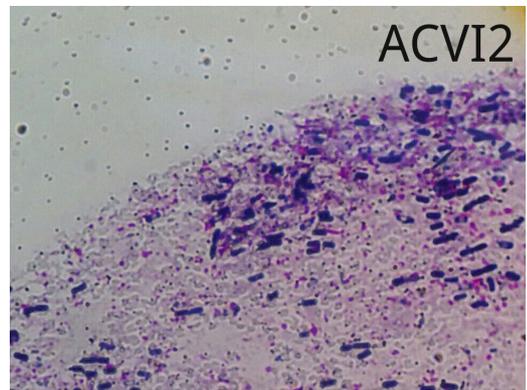


Figura 4: Estirpe ACVI2. Bacilo Gram Positivo.

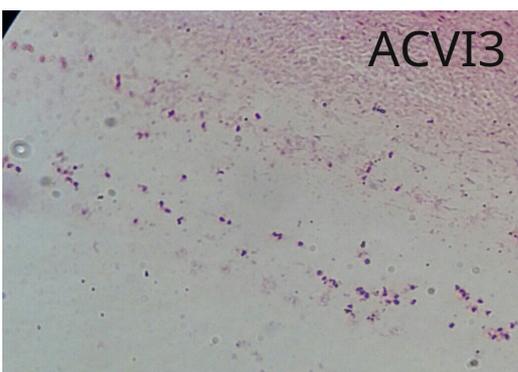


Figura 5: Estirpe ACV3. Bacilo Gram Positivo.

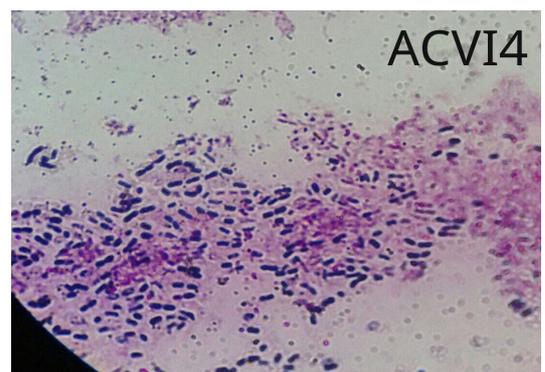


Figura 6: Estirpe ACVI4. Bacilo Gram Positivo

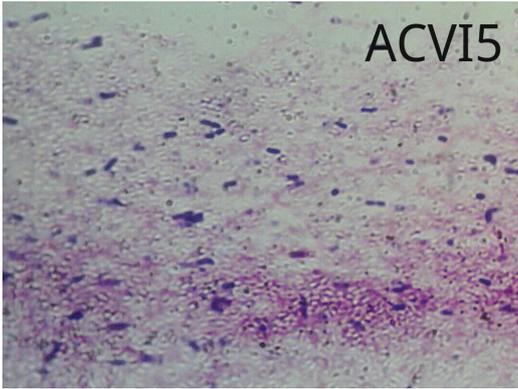


Figura 7: Estirpe ACV5. Bacilo Gram Positivo

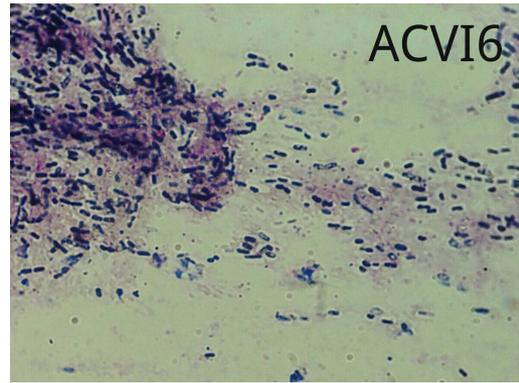


Figura 8: Estirpe ACVI6. Bacilo Gram Positivo

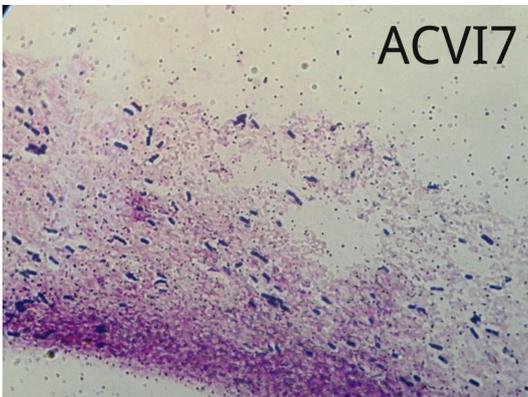


Figura 9: Estirpe ACVI7. Bacilo Gram Positivo.

Em seguida foram realizados testes de confronto em placa com todas as bactérias e assim pôde-se observar as habilidades das estirpes em inibir umas às outras medindo-se a distância entre o final de uma colônia e o início de outra como mostrado na tabela abaixo (tabela 1). Nessa fase de confronto a bactéria P4 apresentou o menor potencial inibitório enquanto as bactérias BAC e ACVI5 apresentaram grande potencial inibidor. Pode-se observar que algumas estirpes de *B. thuringiensis* isoladas produziram bacteriocinas, visto que inibiram o crescimento das demais estirpes.

Tabela 1 – Medições das distâncias (em cm) entre as estirpes de *B. thuringiensis* na realização do teste de confronto em placa.

	BAC	P4	ACVI1	ACVI2	ACVI3	ACVI4	ACVI5	ACVI6
BAC								
P4	1,0							
ACVI1	0,1	0						
ACVI2	0,1	0,2	0,1					
ACVI3	0,5	0,2	0,4	0,1				
ACVI4	0,4	0,1	0,1	0,3	0,3			
ACVI5	0,3	0	0,3	0,3	0,4	0,2		
ACVI6	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,5	
ACVI7	0,5	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1

A atividade entomopatogênica de Bt se deve à presença de cristais proteicos produzidos durante a esporulação. Esses cristais denominados endotoxinas ou proteínas cristal (Cry) podem ser visualizados por microscopia (PRAÇA et al., 2007). Para a confirmação da presença desses cristais nas estirpes das bactérias inibidoras foi realizado esfregaço de cada colônia com posterior coloração com Amido Black. As bactérias que mostraram possuir cristais protéicos foram mostradas nas figuras de 10 a 18 e tabela 2.

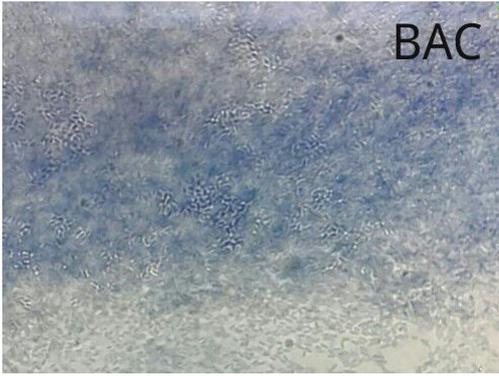


Figura 10: Cristais proteicos da estirpe BAC.

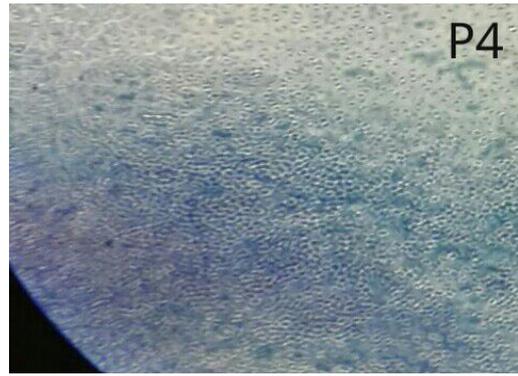


Figura 11: Cristais proteicos da Estirpe P4.



Figura 12: Cristais proteicos da estirpe ACVI1.

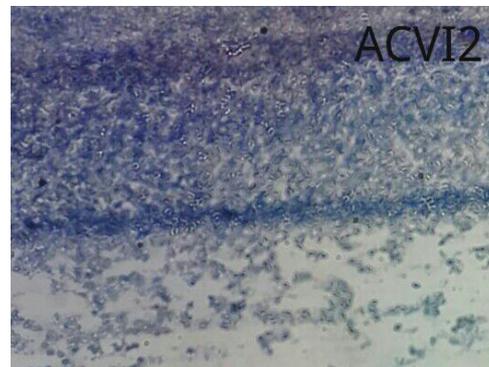


Figura 13: Cristais proteicos da estirpe ACVI2.



Figura 14: Cristais proteicos da estirpe ACVI3.

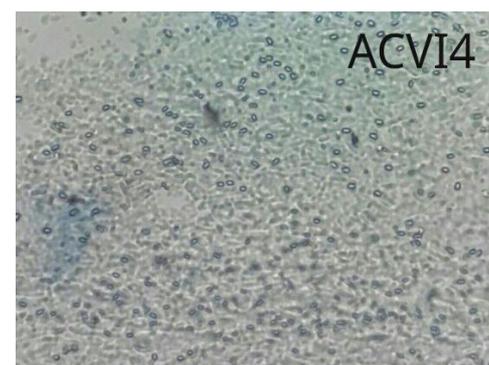


Figura 15: Cristais proteicos da estirpe ACVI4.

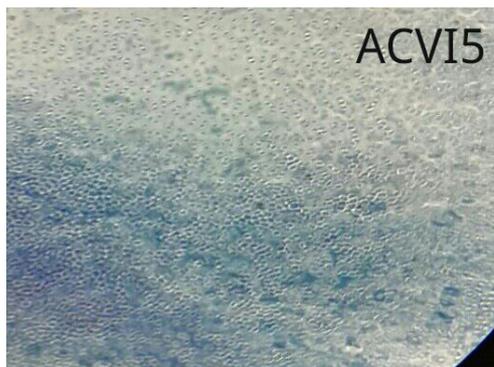


Figura 16: Cristais proteicos da estirpe ACVI5.

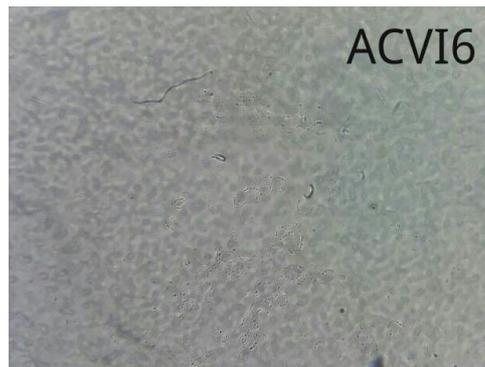


Figura 17: Cristais proteicos da estirpe ACVI6.



Figura 18: Cristais proteicos da estirpe ACVI7.

Tabela 2 – Identificação dos cristais Cry para a confirmação das estirpes bacterianas como *B. thuringiensis*.

Estirpe	Gram	Amido Black
BAC	+	+
P4	+	+
ACVI1	+	+
ACVI2	+	+
ACVI3	+	+
ACVI4	+	+
ACVI5	+	+
ACVI6	+	+
ACVI7	+	+

Posteriormente para a realização do teste de disco difusão uma camada basal de 15 mL de meio LB ágar inoculado com a bactéria P4 foi colocada em placas de Petri. Após o resfriamento da camada, foram posicionados 5 discos de filtros de 1 cm de diâmetro embebidos em bactérias (Bt) previamente cultivadas em meios LB líquidos. Após 72 horas de incubação a 28 °C, verificou-se o aparecimento de uma área de inibição, ou halos; estes foram medidos e uma média foi calculada para se avaliar a intensidade de inibição. A estirpe ACVI5 produziu em média 0,24 cm de halo, enquanto a estirpe BAC produziu 0,12 cm. Os halos formados podem ser observados nas figuras 6 e 7 abaixo. A bactéria P4 foi escolhida para ser colocada no meio, visto ser a bactéria mais inibida pelas outras durante o teste de confronto em placa, como já descrito anteriormente.

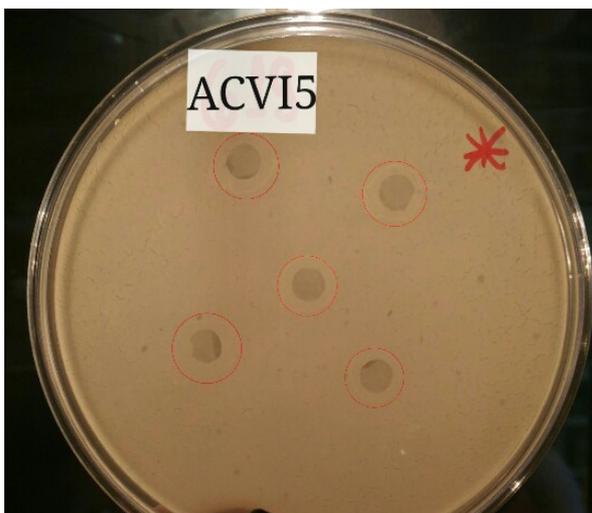


Figura 6: Estirpe ACVI5 formando halos de inibição contra a estirpe P4. Figura 7: Estirpe BAC inibindo a P4.

Pode-se observar que os halos (destacados em vermelho) formados não são tão expressivos por uma falha técnica durante o procedimento, pois a quantidade utilizada de bactéria P4 foi muito maior que o adequado para observação de halos mais claros. Foram adicionados 5 ml da estirpe P4. Essa quantidade, provavelmente, foi excessiva e, haverá a necessidade de se repetir o experimento utilizando-se, agora, 1 mL da estirpe.

O Brasil é um país tropical com economia fortemente ligada à produção agrícola (ANGELO et al., 2010), em que insetos se apresentam como pragas que prejudicam a produção alimentar, além de serem vetores de uma série de patologias como

dengue, zika, malária, entre outras (FORATTINI et al., 1995). O controle de tais insetos atualmente tem sido feito com inseticidas sintéticos, o que demonstra a necessidade de se produzir no Brasil inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* (VORA, 1999; POOPATHI; KUMAR, 2003; PRABAKARAN; BALARAMAN, 2006).

Glare; O'Callaghan (2000) também salientam a importância de estudos a respeito do impacto deste entomopatógeno, com o objetivo de demonstrar sua capacidade de substituição aos inseticidas convencionais, minimizando os riscos e impactos ambientais e para a saúde da população.

As bacteriocinas da classe II possuem menor peso molecular (< 10 kDa) e são relativamente termoestáveis, têm um espectro de ação limitado e sua atividade pode estar associada a algum tipo de receptor. Sabe-se ainda que essa classe de bacteriocina depende de fosfolipídios aniônicos para realizar a interação inicial com a membrana da célula alvo (SCHULZ et al., 2003). A bacteriocina produzida pode possuir baixo peso molecular e isso pode auxiliar na sua dispersão pelo meio de cultura, dificultando, assim, a formação de um halo bem definido que possa ser usado para a obtenção de medidas para futuras análises.

Em se tratando de antimicrobianos a maior ênfase é dada as bacteriocinas, definidas como peptídeos antimicrobianos que destroem ou inibem o crescimento de outras bactérias taxonomicamente relacionadas com a estirpe produtora. Muitas bactérias ácido-lácticas produzem uma grande diversidade de bacteriocinas, sendo a nisina a única bacteriocina reconhecida pela FDA e usada como conservante alimentar. Muitas bacteriocinas têm sido caracterizadas bioquimicamente e geneticamente. Embora sejam conhecidas, a função estrutural, a biossíntese e o modo de ação de algumas bacteriocinas, muitos aspectos desses compostos ainda permanecem desconhecidos, principalmente, nas estirpes de *B. thuringiensis* (FIB, 2010).

## VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das amostras coletadas do solo nove apresentaram morfologia típica sugerindo serem *Bacillus thuringiensis*;

Somente duas estirpes apresentam produção para bacteriocinas, fato observado pelo ensaio de inibição entre estirpes e confirmado pelo Gram corado com Amido Black;

O composto antimicrobiano, secretado pelo bacilo no meio em que ele está, inibe outras estirpes de *B. thuringiensis*.

O trabalho desenvolvido mostrou o potencial biotecnológico do *B. thuringiensis*. Porém, a metodologia utilizada para verificar o potencial de inibição pela estirpe produtora de bacteriocina, usando o disco de papel de filtro, pode apresentar muitas fontes de erro levando a não formação halos nos testes realizados, entretanto essa metodologia ainda é a melhor existente para bioensaio com bacteriocina.

Vários fatores podem influenciar na difusão das bacteriocinas no meio, incluindo a concentração de sal, pH, nitrito e nitrato, fase aquosa disponível para difusão, conteúdo lipídico e superfície lipídica disponível para solubilização. A distância que a molécula de bacteriocina precisa percorrer para alcançar a célula-alvo e o número dessas células com relação à quantidade do antimicrobiano são considerações importantes a serem feitas na predição de sua atividade.

## REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 40, p. 1143-1163.

ANGELO, E.A.; VILAS-BÔAS, G.T.; GOMEZ, R.J.H. 2010. **Bacillus thuringiensis: características gerais e fermentação**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, out./dez. 2010.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p. 57-93.

BRAVO, A. et al. 1998. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972.

CERON, J. et al. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied environmental microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 3826-3831.

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-Áçucar. **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.

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

FIB. FOOD INGREDIENTS BRASIL. AGENTES ANTIMICROBIANOS QUÍMICOS E NATURAIS. N, 15, p. 36-42. 2010.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 20, p. 338-343, 2002.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. 2000. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 350 p

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. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 12, n. 1-3, p. 39-86.

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

LECADET, M.M. et al. 1991. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied environmental microbiology**, v. 58, n. 3, p. 840-849.

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

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. de; MARTINS, É. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v.41, p.291-295, 2007.

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

PRABAKARAN, G.; BALARAMAN, K. **Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis.** Biological Control, Orlando, v. 36, n. 1, p. 288-292, 2006.

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

POLANCZYK, R.A. 2004. 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.

POOPATHI, S.; KUMAR, K. A. **Novel fermentation media for production of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis.** Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 96, n. 4, p. 1039-1044, 2003.

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

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G.; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, p. 1-8, 2005.

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

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. 2010.

VORA, D.; SHETNA, Y. I. **Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki in oil seed meal extract media contain cystine.** World Journal Of Microbiology & Biotechnology, Oxford, v. 15, n. 6, p. 747-749. 1999