



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

FERNANDA GUIMARÃES BERNARDES

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*

BRASÍLIA

2013

FERNANDA GUIMARÃES BERNARDES

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Professor Dr. Paulo Roberto Queiroz.

Brasília
2013

Dedicatória e Agradecimento

Dedico este trabalho de conclusão de curso a Deus. Criador de tudo e Amor infinito. Pela realização deste, agradeço a todos os meus amigos e colegas que estiveram sempre ao meu lado; A todos os colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e, em especial, à pesquisadora responsável, Rose Monnerat, pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa no laboratório; À amiga Deborah Lamar que iniciou este projeto comigo na Iniciação Científica oferecida pelo Uniceub; Ao orientador Paulo Queiroz e à colaboradora Érica Martins, que foram os responsáveis por todo o sucesso no andamento da pesquisa; E a toda minha família, principalmente pai, mãe, irmãs e avós, que são a base de tudo e foram fonte de total apoio diante de qualquer obstáculo e dificuldade encontrados, além dos momentos de alegria e descontração que deixaram o esforço e o cansaço mais leves. Obrigada a todos, este trabalho também é mérito de vocês.

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*

FERNANDA GUIMARÃES BERNARDES*; ÉRICA SOARES MARTINS QUEIROZ**
PAULO ROBERTO QUEIROZ*** ROSE GOMES MONNERAT**

Resumo

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram positiva comumente presente em solos. É um importante agente de controle biológico de pragas na agricultura e de diversos animais vetores de doenças em humanos, além de promissor na produção de substâncias antimicrobianas. Sua toxicidade ocorre por inclusões protéicas produzidas durante a esporulação que possuem a forma de cristais, sendo estas proteínas altamente específicas e codificadas pelos genes *cry*. O objetivo deste trabalho foi isolar estirpes de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo do Distrito Federal e realizar sua caracterização biológica e molecular. O isolamento ocorreu pela aplicação de choque térmico e identificação por microscopia de contraste de fase, sendo obtidas 5 estirpes de *B. thuringiensis*, com as quais foram feitos bioensaios seletivos contra espécies de dípteros, aos quais as estirpes não apresentaram efeito tóxico, e contra espécies de lepidópteras, às quais as estirpes apresentaram efeito tóxico, sendo que duas estirpes, Bt20 e Bt21, provocaram mortalidade acima de 50% em duas espécies de lepidópteras. A estirpe Bt19 foi capaz de inibir o crescimento de outras duas estirpes. Todas amplificaram por PCR para o gene *cry1* e apresentaram a proteína 65 kDa no gel de proteína. É fundamental que novos isolamentos sejam feitos e que os estudos com as estirpes já isoladas continuem na busca de novas estirpes e conhecimentos de *B. thuringiensis* para o desenvolvimento de novos produtos eficientes para o controle biológico.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico. Genes *cry*. Atividade antimicrobiana.

*Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

**Doutoras da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

***Doutor em Biologia Animal - UnB, Professor de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram positiva, comumente presente em solos (FIUZA, 2010). É uma espécie de eubactéria pertencente à Família Bacillaceae e ao gênero *Bacillus*, sendo utilizado como inseticida biológico há algumas décadas para controle de pragas na agricultura (VALADARES-INGLIS et al., 1998; PRAÇA et al., 2004; FIUZA, 2010). Sua importância também está relacionada à área médica, por apresentar ainda patogenicidade a insetos da ordem Coleoptera, Diptera e Hemiptera e, além desses, para malófagos, ácaros, nematódeos, platelmintos e protozoários (SCHNEPF et al., 1998; LÓPEZ e CERON, 2007). A toxicidade desta bactéria ocorre pelas suas inclusões protéicas que são produzidas durante a esporulação e se acumulam na extremidade dos esporos com a forma de cristais, sendo tóxicas ao serem ingeridas pelas larvas de seus insetos-alvos (FIUZA, 2010).

Este bacilo foi isolado pela primeira vez no Japão, em 1902, na fase larval do inseto *Bombyx mori*, o bicho-da-seda, pertencente à Ordem Lepidoptera. E, em 1911, foi isolado novamente na lagarta *Anagasta kuehniella* pelo alemão Berliner. Este último isolamento foi determinante para o atual nome do bacilo: *Bacillus thuringiensis*, em homenagem a província alemã Thuringia, local em que a espécie da mariposa infectada foi encontrada (ROH et al., 2007; SILVA, 2008). Depois desses isolamentos, apenas em 1929 começaram as pesquisas de campo com *B. thuringiensis*, as quais demonstraram bons resultados no controle de pragas na agricultura, reconhecendo este bacilo como o primeiro entomopatógeno, o que desencadeou inúmeros estudos que possibilitaram a sua utilização comercial (SILVA, 2008).

Durante este período, acreditava-se que *B. thuringiensis* era um entomopatógeno apenas para a ordem Lepidoptera, pois só havia sido encontrado nesses insetos até então (SOBERÓN e BRAVO, 2010). Contudo, em 1976, foi isolada uma variação de *B. thuringiensis* patogênica em larvas de dípteros chamada de *B. thuringiensis israelensis* (Bti), trazendo a possibilidade de sua utilização para o controle dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium* (POLANCZYK et al., 2003). Em 1983, outra variação do *B. thuringiensis* foi identificada, desta vez em insetos coleópteros: *B. thuringiensis tenebrioni*. O achado destas duas variações

incentivou muitos estudos envolvendo esta bactéria, levando ao isolamento de diferentes estirpes produtoras de diversas toxinas com importância no controle de insetos vetores de doenças (SOBERÓN e BRAVO, 2010).

Além de tudo, as estirpes de *B. thuringiensis* ainda são capazes de produzir toxinas eficientes no combate de outros microrganismos (SCHULZ, BONELLI e BATISTA, 2005). E como já relatado por JACK et al., (1995), diversas espécies de bactérias do gênero *Bacillus* podem produzir substâncias com atividade antimicrobiana. Isso se torna de grande interesse para a indústria alimentícia devido ao uso potencial de bactérias como conservantes de alimentos para inibir outras bactérias do tipo Gram positivas, que são importantes patógenos de veiculação alimentar, tais como, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e, ainda, *Bacillus cereus* (CLEVELAND et al., 2001).

As espécies de *B. cereus* e *B. thuringiensis* são semelhantes morfológicamente entre si (SOBERÓN e BRAVO, 2010). Entretanto, na microscopia de contraste de fase é possível se identificar os cristais protéicos nos esporângios de *B. thuringiensis*, o que nos outros bacilos não é evidente (KONEMAN et al., 2008). Estudos que comparam certos genes e o funcionamento de algumas enzimas em *B. cereus* e *B. thuringiensis* mostram que estes bacilos são muito semelhantes geneticamente, apesar do *B. cereus* ser causador de doenças oportunistas em humanos e o *B. thuringiensis* não causar mal a espécie humana (SOBERÓN e BRAVO, 2010), pois as toxinas produzidas por *B. thuringiensis* são altamente específicas, sendo inofensivas a todos os animais não alvos, o que diminui também o impacto ambiental causado por seus produtos, ao contrário de produtos agrícolas sintéticos (PRAÇA et al., 2004).

Vale então ressaltar que em mais de 50 anos de utilização de *B. thuringiensis* esta bactéria apenas trouxe muitas vantagens relacionadas ao controle de pragas agrícolas e, mesmo que mais tarde, ao controle biológico de insetos vetores de doenças em humanos (MONNERAT e BRAVO, 2000). E, em 100 anos de história, já foram identificadas mais de 40.000 estirpes (CÍCERO et al., 2009), o que mostra a grande variabilidade desta bactéria na natureza. Cada estirpe ou sorotipo pode produzir uma toxina diferente e cada toxina agirá em uma determinada espécie alvo, o que permite o estudo detalhado de cada uma destas estirpes e sorotipos do bacilo (SILVA, 2008).

As preparações derivadas de *B. thuringiensis* são, portanto, consideradas importantes inseticidas biológicos por provocarem uma ação intestinal tóxica e fatal em larvas de diversos grupos de insetos. A toxina de *B. thuringiensis* pode ser chamada de corpo paraesporal (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004) ou de delta-endotoxina (COSTA, 2009), sendo cristais formados por uma ou mais proteínas codificadas pelos genes *cry*. Outro tipo de proteína que compõe os cristais é codificado pelo gene *cyt* (COSTA, 2009). Enquanto algumas estirpes de *B. thuringiensis* apresentam apenas um gene *cry*, outras apresentam complexas combinações de genes. O gene *cyt* também está presente em várias linhagens de *B. thuringiensis*, auxiliando na sua ação (COSTA et al., 2010).

Atualmente são realizados inúmeros procedimentos que isolam determinadas estirpes de *B. thuringiensis* para caracterização molecular e morfológica. Esta caracterização é feita basicamente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e de bioensaios. Os bioensaios testam o potencial patogênico do bacilo em determinadas espécies de insetos e a caracterização molecular é importante para identificar os diferentes tipos de genes *cry* existentes, isolar novos tipos e também para verificar sua toxicidade em relação a algumas espécies animais. A caracterização molecular e fenotípica ajuda também a identificar algumas estirpes de *B. thuringiensis* que possuem dois tipos de proteínas Cry, que podem atuar ou não contra uma ou mais espécies diferentes de insetos (SILVA, 2008).

Os objetivos deste trabalho foram isolar estirpes de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo do Distrito Federal; fazer a caracterização biológica das estirpes isoladas, por meio de bioensaios contra várias espécies de insetos; identificar entre estas estirpes de *B. thuringiensis* potenciais agentes produtores de substâncias com ação antimicrobiana; e realizar a caracterização molecular destas estirpes, por meio de PCR e perfil protéico.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta

Foram coletadas amostras de solo em diferentes locais do cerrado do Distrito Federal no período de agosto do 2º semestre de 2011 a maio do 1º semestre de 2013. O registro para a coleta das amostras de solo foi feito pelo site Sisbio e emitido pelo número 30683-1. O devido comprovante do registro de coleta se encontra no anexo A.

2.2 Isolamento das estirpes

Para a seleção das estirpes, foram pesados 100 mg de cada amostra de solo para serem colocados em um tubo de polietileno de 1,5 mL, acrescentando-se à amostra 1,0 mL de solução salina NaCl a 0,85% preparada previamente e autoclavada. Em seguida, o tubo foi submetido à agitação para homogeneizar adequadamente a amostra na solução. As amostras foram então incubadas em placa aquecedora a 80°C durante 12 minutos e, após este período, foram transferidas imediatamente para um recipiente com gelo a aproximadamente 4°C por 5 minutos para sofrerem a ação de um choque térmico. Após o procedimento, foi utilizada uma alça para entrar em contato com a amostra e inocular a mesma em placa contendo meio EMBRAPA (MONNERAT et al., 2007) com penicilina (100 mg/L) e em placa com meio EMBRAPA com estreptomicina (25 mg/L), ambos os meios com antibióticos foram preparados também previamente. As placas inoculadas foram incubadas em estufa por um período de 24 h a 48 h a 28°C.

2.3 Microscopia

As amostras das placas que apresentaram crescimento foram inoculadas em meio líquido EMBRAPA e incubadas a 28°C em incubador rotativo a 200 rpm para serem visualizadas por microscopia de contraste de fase após 48 h. Após este período, lâminas com 10 µL de cada amostra crescida foram preparadas, devidamente identificadas e visualizadas ao microscópio com aumento de 1000x. Nas amostras crescidas em meio EMBRAPA com penicilina procurou-se visualizar *B. thuringiensis* (Bt) ou *B. cereus* (Bc), ambos com esporos mais ovalados, porém com a diferença do primeiro apresentar além dos esporos a visualização de cristais. Já nas amostras crescidas em meio EMBRAPA com estreptomicina procura-se visualizar outros bacilos de interesse. As amostras identificadas como Bt foram

utilizadas nesta pesquisa, enquanto os demais bacilos identificados foram separados para demais estudos.

2.4 Bioensaios Seletivos

Em todos os bioensaios, as amostras a serem testadas e as amostras para controle positivo foram colocadas previamente para crescerem em meio líquido EMBRAPA por 48 h a 72 h com agitação de 200 rpm e a 28 °C. No dia de cada bioensaio foi feita a microscopia de contraste de fase das amostras de Bt para visualização da quantidade de esporos e cristais. Havendo a visualização dos mesmos prosseguiu-se com o bioensaio. As amostras foram testadas contra dípteros - *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e contra lepidópteros - *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda*. Os insetos utilizados nos bioensaios, assim como, o modo de preparo da dieta artificial, descrita em MORINAGA et al. (2007) e presente no Anexo B utilizada nos bioensaios para *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*, foram obtidos a partir da Colônia do Prédio do Controle Biológico 2 (PCB2). Praticamente toda esta pesquisa foi desenvolvida no Prédio do Controle Biológico 1 (PCB1) – Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os bioensaios foram feitos segundo o relatado em PRAÇA et al. (2003) e MORINAGA et al. (2007).

2.4.1 Bioensaios contra dípteros - *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Foram utilizados três copos plásticos de 300 mL para cada amostra e controle, estes foram preenchidos com 100 mL de água destilada e, em cada um, foram colocadas 25 larvas de 2º ou 3º estágio de *C. quinquefasciatus* ou *A. aegypti*, dependendo do inseto-alvo do bioensaio. No caso de bioensaio com *C. quinquefasciatus* foi colocada também uma pequena quantidade de levedo de cerveja em cada copo. O controle negativo foi feito sem acrescentar nenhuma estirpe de bactéria, ficando pronto apenas com as etapas já descritas. Já no controle positivo, foi acrescentado ao copo 1 mL de estirpe bacteriana já efetivamente testada e com mortalidade alta para o inseto alvo do bioensaio, sendo a estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) a utilizada como controle positivo e obtida a partir da Coleção de

Bacilos Entomopatogênicos do LBE. Finalmente, foi feito com as amostras o mesmo que para o controle positivo, ou seja, acrescentou-se 1 mL da amostra aos seus respectivos copos. A leitura do bioensaio foi feita 24 h após o seu início, sendo feita a contagem das larvas que permaneceram vivas em cada copo e subtraindo do total de larvas colocadas para se chegar à mortalidade obtida.

2.4.2 Bioensaio contra lepidópteras

Em todos os bioensaios com lepidópteras, o controle positivo utilizado foi a estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1), também retirada da Coleção de Bacilos Entomopatogênicos do LBE. E todos foram mantidos após o preparo e primeira leitura em sala própria para bioensaios com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 h.

2.4.2.1 Bioensaio contra *Anticarsia gemmatalis*

No bioensaio foram utilizados três copos de 50 mL devidamente identificados para cada estirpe a ser testada e para cada grupo controle. Primeiramente, foi preparada uma dieta específica para o bioensaio com *A. gemmatalis*. A dieta foi vertida nos copos plásticos de 50 mL, ocupando o fundo de cada copo com aproximadamente 10 mL da dieta. Então, 150 µL de água destilada estéril foram acrescentados aos copos de controle negativo, ou seja, aquele sem presença de bactéria, e 150 µL de cultura bacteriana do controle positivo e das amostras foi acrescentado cada qual aos seus respectivos copos. Por fim, dez lagartas de *A. gemmatalis* de 2º estágio foram colocadas em cada copo e estes foram fechados com tampas de acrílico adequadas. Após 48 h foi feita a primeira leitura de mortalidade e as lagartas vivas foram transferidas para um novo copo plástico de 50 mL com tampa de acrílico e com nova dieta de troca sem a presença de bactérias. A segunda e última leitura foi feita no quinto dia do bioensaio com a devida contagem de mortalidade. Para avaliação foram contabilizadas as duas leituras.

2.4.2.2 Bioensaio contra *Plutella xylostella*

Foram utilizados copos plásticos de 300 mL devidamente identificados e, em cada copo, foram colocados 90 mL de água destilada e 10 mL da respectiva cultura bacteriana, nos casos das amostras a serem testadas e do controle positivo. No caso do controle negativo foi colocado 100 mL de água destilada. Em seguida, foi acrescentada a todos os copos uma gota de espalhante adesivo Extravon e, em cada copo, foram imersos por 10 minutos quatro pedaços de folhas de brássicas, as quais foram lavadas no mesmo dia com água corrente e esponja, tiveram o excesso de umidade retirado com papel toalha e foram cortadas no tamanho 6x5 cm, aproximadamente. Após o tempo citado, as folhas foram removidas dos copos e colocadas para secar por um período aproximado de 1 hora. Cada pedaço da folha foi então colocado em uma placa de Petri, na qual foram acrescentadas 10 lagartas de 2º estágio de *P. xylostella*. Após 48 h, foi feita a primeira leitura da quantidade de lagartas vivas e mortas e a troca das folhas de brássicas por novas folhas sem tratamento com a amostra bacteriana. No quinto dia do bioensaio, a segunda e última leitura foi feita e a mortalidade causada pela amostra na espécie foi avaliada.

2.4.2.3 Bioensaio contra *Spodoptera frugiperda*

Primeiramente, foi preparada uma dieta específica para o bioensaio com *S. frugiperda*. A dieta foi vertida em placas de cultura de células contendo 24 poços, com a dieta ocupando metade de cada poço. Foram preenchidas com a dieta uma placa para cada amostra, uma para o controle positivo e uma para o controle negativo. Então, 35 µL de água destilada estéril foram acrescentados aos poços da placa de controle negativo, ou seja, aquele sem presença de bactéria, e 35 µL de cultura bacteriana do controle positivo e das amostras foi acrescentado aos poços das suas respectivas placas. Por fim, uma lagarta de *S. frugiperda* de 2º estágio foi colocada em cada poço de todas as placas, que foram fechadas com tampas de acrílico próprias e prendidas com ligas elásticas. Após 48 h foi feita a primeira leitura de mortalidade e as lagartas vivas foram transferidas cada uma para um copo plástico de 50 mL, cada um também fechado com tampa própria de acrílico e contendo nova dieta de troca sem presença de bactéria. A segunda e última leitura foi feita no sétimo dia do bioensaio com a devida contagem da mortalidade e, para avaliação, foram contabilizados os resultados das duas leituras.

2.5 Ensaio para avaliação de inibição

Para o teste de inibição, as estirpes de Bt foram crescidas em meio LB (Luria-Bertani) líquido durante 48 h a 200 rpm e 28°C previamente. No dia do teste, foram utilizadas placas de Petri e nestas foi depositada uma camada basal de 15 mL de meio ágar LB. Após o resfriamento da camada, foram posicionadas três ponteiros de 1000 µL sobre a camada de cada placa para formação de poços. Uma vez posicionadas as ponteiros, 25 mL de ágar LB e 1 mL da amostra bacteriana crescida foram misturadas em tubo cônico de 50 mL e depositadas sobre a camada basal. Após a solidificação do meio, as ponteiros foram retiradas e os poços foram preenchidos com 50 µL de outra estirpe. O procedimento foi feito confrontando entre si todas as estirpes de Bt isoladas. Após 48 h de incubação a 28°C foi avaliado o aparecimento da zona de inibição feita pela bactéria dentro do poço e a bactéria ao redor do poço.

2.6 Extração de DNA

As amostras bacterianas para a extração de DNA foram cultivadas em meio EMBRAPA sólido por 16 h a 28°C. Após este período, para cada amostra, todo o crescimento bacteriano da placa foi retirado com uma alça e colocado em tubo de polietileno de 1,5 mL devidamente identificado e com 200 µL de água ultrapurificada estéril. As amostras foram congeladas no freezer a -80°C por 20 min e depois fervidas em banho-maria a 100°C por 10 min e, por fim, incubadas no gelo durante dois minutos. As amostras foram então centrifugadas em velocidade máxima 12.000xg por 5 min e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo para ser utilizado. As amostras foram mantidas a -20°C. O DNA deve ser utilizado em até 48 h após a extração devido a não eliminação de DNAses do método realizado.

2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a caracterização molecular das amostras, foram utilizados oligonucleotídeos gerais na identificação do gene *cry1* com produto de amplificação esperado entre 543 e 594 pb (pares de base). Para a realização da PCR, foram utilizados 5,0 µL do produto de extração de DNA das amostras, colocados em tubo

de polietileno de 0,2 mL, sendo 5,0 µL de água destilada para o controle negativo. Foram acrescentados a cada tubo 25 µL de uma reação previamente preparada contendo 16 µL de água destilada, 3,0 µL de tampão PCR 10X, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 1,0 µL de cada oligonucleotídeo [*Primer 1 – cry1* (d – direto) 12,5 µM e *Primer 2 – cry1* (r – reverso) 10 µM], 3,0 µL de MgCl₂ 50 mM e 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase 5 U/µL, totalizando um volume de 30 µL por amostra. Os tubos foram colocados em termociclador usando o programa descrito por BRAVO et al. (1998). Após amplificação, 20 µL de cada produto de PCR foram colocados em gel de agarose 1,5% e submetidos a eletroforese 110 V (VOLTZ) por aproximadamente 90 min. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. A estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) foi utilizada como amostra padrão.

2.8 Extração de Proteína

As amostras bacterianas para a extração de proteínas de acordo com LECADET et al. (1991) foram cultivadas em meio EMBRAPA líquido por 72 h em incubador rotativo a 200 rpm e 28°C. Após este período, as amostras foram observadas ao microscópio para verificar o crescimento da estirpe e a presença de esporos e cristais. Foram então distribuídos 3 mL de cada estirpe em dois tubos de polietileno de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados em velocidade máxima por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de cada amostra foi ressuspenso em 1,5 mL de solução NaCl 5M. As amostras foram centrifugadas novamente em velocidade máxima por 15 min e o sobrenadante foi desprezado. As paredes internas do tubo foram então secas com papel filtro, tomando-se o cuidado para não encostar o papel na amostra e tentando remover todo o NaCl restante no tubo. O pellet foi então ressuspenso em 1,5 mL de solução de inibidores de proteases, constituído de 1 mM de PMSF com 100 mM de EDTA pH 8,0. As amostras foram centrifugadas mais uma vez em velocidade máxima por 15 min e o sobrenadante foi ressuspenso novamente com 1,5 mL da solução de inibidores de proteases, tal procedimento se repetiu mais uma vez, porém com 500 µL da solução, sendo as amostras, por fim, mantidas a -20°C.

2.9 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS

As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS preparado a 10% de gel separador e 4% de gel concentrador, utilizando-se 10 µL da extração de proteína de cada amostra. A eletroforese foi feita em aparelho Mini VE Hoefer a 120 V por aproximadamente 1 h e 40 min e o gel foi corado com solução de Comassie Blue para análise. As estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* foram utilizadas como amostras padrão.

3 Resultados e Discussão

3.1 Coleta, isolamento e microscopia

Foram coletadas 20 amostras de solo de diferentes locais do cerrado do Distrito Federal. Destas 13 apresentaram crescimento de *Bacillus* sp., as quais geraram o isolamento de 19 colônias. E, dentre estas, 5 foram confirmadas como *B. thuringiensis* pela microscopia de contraste de fase, representando 26,32% dos isolados. Estas estirpes foram denominadas Bt18, Bt19, Bt20, Bt21 e Bt23. Este resultado difere do descrito por POLANCZYK et al. (2004) que obteve de 371 isolados de *Bacillus* sp., provenientes de amostras de solo da região Sul, 293 identificados como *B. thuringiensis*, ou seja, 79%.

Apesar da grande diferença na quantidade de *Bacillus* sp. isolados a porcentagem ainda mostra um baixo isolamento de *B. thuringiensis* desta pesquisa comparada a de Polanczyk. Entretanto, o isolamento obtido no presente estudo apresentou porcentagem próxima ao trabalho de GOBATTO et al. (2010) que de 555 isolados de solo, tanto urbano quanto rural, também provenientes do Sul do Brasil, identificou 172 amostras como *B. thuringiensis*, ou seja, 31%.

Estes resultados, tanto distinto quanto semelhante, respectivamente, podem ser explicados devido a diversos fatores como às transformações microbianas observadas no solo pelas diferentes populações nele existentes, assim como, suas diversas reações químicas que podem ser alteradas por interferências presentes no ecossistema (CASTRO e PADRO, 1993), as quais podem estar associadas ao regime hídrico, ao clima e às estações do ano em cada região (MIORELLI et al., 2005). Portanto, a presença de *B. thuringiensis* em diversos ambientes pode ter relação com os fatores bióticos e abióticos encontrados no hábitat (PINTO e FIUZA, 2003; ARRIETA e ESPINOZA, 2006; AZAMBUJA et al., 2009).

Ainda assim, trabalhos mostram que está bactéria pode ser isolada a partir de diferentes ambientes (MONNERAT et al., 2001; BRAVO et al., 1998). A comparação de alguns trabalhos já evidenciou essa ampla distribuição de *B. thuringiensis* (ALVES et al., 2011), pois este possui uma grande capacidade de sobrevivência em condições adversas, além de ser transportado facilmente pelo vento, chuva e animais (CHIN et al. 1999), o que é confirmado neste estudo pela obtenção de 5 isolados confirmados.

As características de *B. thuringiensis* observadas na microscopia estão de acordo com MONNERAT e BRAVO (2000) que descrevem os esporos como entre elípticos e cilíndricos e com a presença de cristais protéicos formados durante a esporulação. A Tabela 1 informa os isolados de *B. thuringiensis* obtidos na pesquisa com a denominação que terão ao longo da mesma. E a Tabela 10 presente no Anexo C apresenta a data e as coordenadas geográficas das coletas, assim como, o resultado do isolamento em cada local.

Tabela 1. Amostras isoladas de *B. thuringiensis*.

Local	Isolados de <i>B. thuringiensis</i>
1. Lago Norte I	Bt18
2. Asa Sul I	Bt19
3. Asa Norte I	Bt20 e Bt21
4. Asa Sul II	Bt23

3.2 Bioensaios seletivos

3.2.1 Bioensaio contra dípteros

Nos bioensaios contra dípteros, nenhuma das amostras isoladas de Bt provocou mortalidade significativa para o inseto-alvo, sendo a porcentagem de mortalidade de algumas amostras igual ou até inferior a porcentagem apresentada pelo controle negativo. Os resultados do bioensaio para *A. aegypti* foram apresentados usando-se o total de larvas vivas e mortas, somando-se as três repetições utilizadas, e a da mortalidade obtida por cada amostra (Tabela 2). Os resultados também foram apresentados de modo a poder se visualizar de forma comparativa a mortalidade apresentada pelas amostras e controles (Figura 1). O

mesmo foi feito na apresentação dos resultados para *C. quinquefasciatus* (Tabela 3 e Figura 2).

Tabela 2: Mortalidade obtida no bioensaio para *A. aegypti* utilizando-se cinco estirpes de Bt e os controles positivo e negativo.

Amostras	Avaliação		Mortalidade para <i>A. aegypti</i> (%)
	Vivas	Mortas	
Controle Negativo	63	12	16,0
Controle Positivo	0	75	100,0
Bt18	75	0	0
Bt19	71	4	5,33
Bt20	72	3	4,0
Bt21	71	4	5,33
Bt23	71	4	5,33

Figura 1. Resultado de Bioensaio para *A. aegypti* utilizando-se 5 estirpes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).

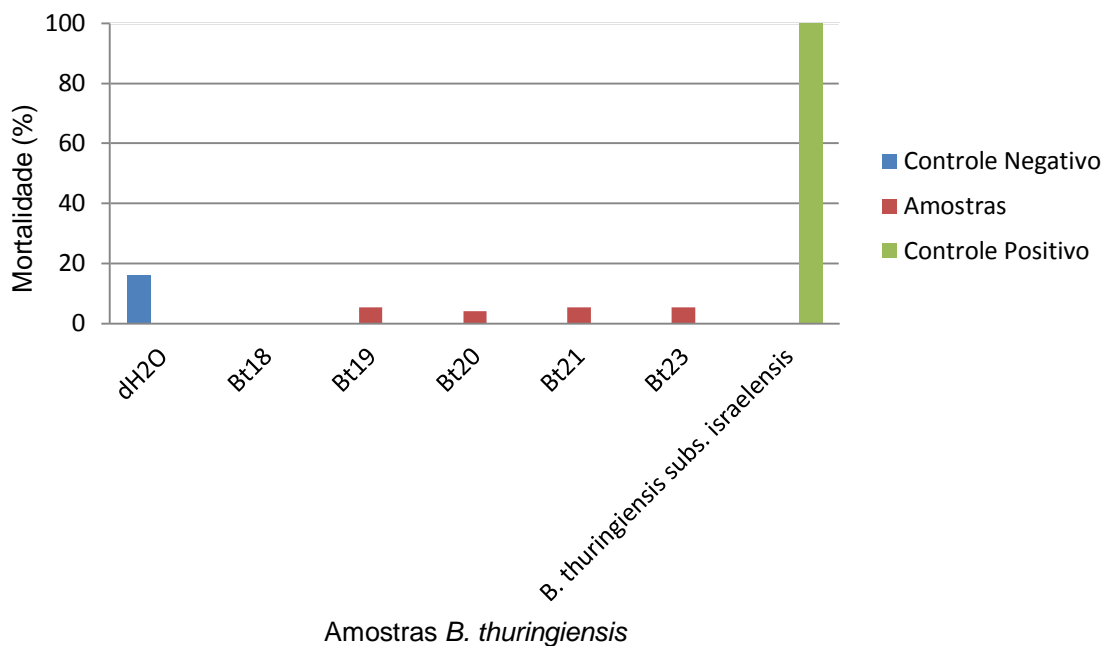
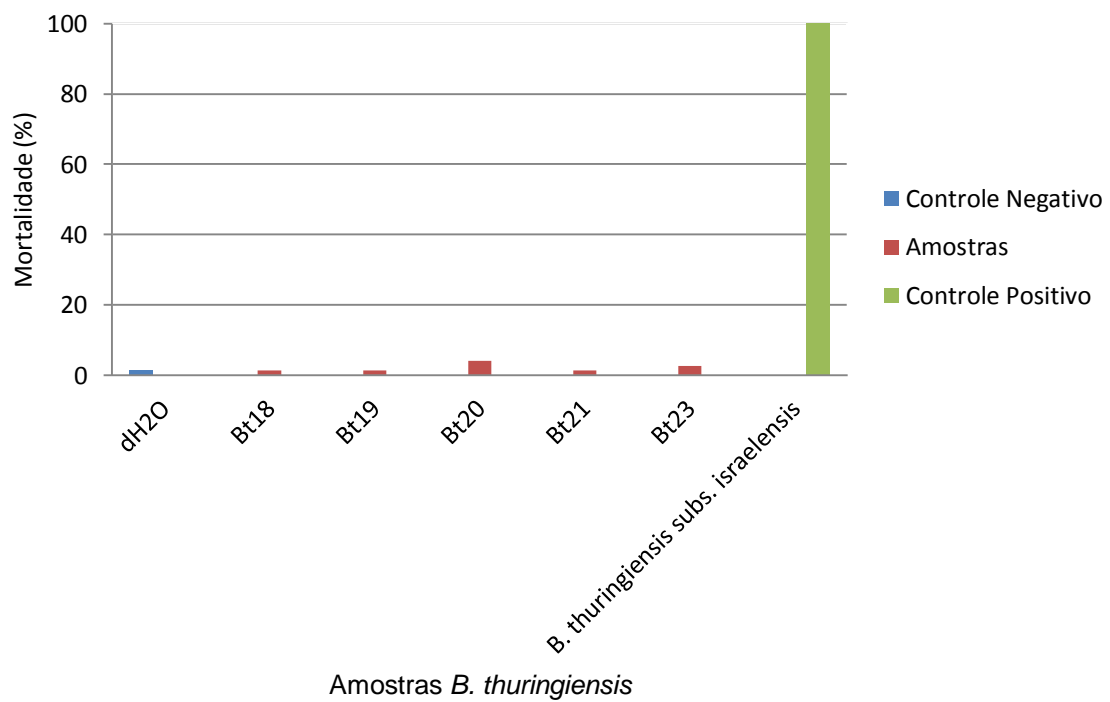


Tabela 3: Mortalidade obtida no bioensaio para *C. quinquefasciatus* utilizando-se cinco estirpes de Bt e os controles positivo e negativo.

Amostras	Avaliação		Mortalidade para <i>C. quinquefasciatus</i> (%)
	Vivas	Mortas	
Controle Negativo	74	1	1,33
Controle Positivo	0	75	100,0
Bt18	74	1	1,33
Bt19	74	1	1,33
Bt20	72	3	4,0
Bt21	74	1	1,33
Bt23	73	2	2,67

Figura 2. Bioensaio para *C. quinquefasciatus* utilizando-se 5 estirpes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).



Estes dados já eram esperados devido à dificuldade de se isolar do solo estirpes de *B. thuringiensis* eficientes no controle de dípteros (PRAÇA et al., 2004; MARTÍNEZ et al., 2005), como relatado no trabalho de CAMPANINI et al. (2012) no qual de 76 colônias de *B. thuringiensis* isoladas, apenas 8, aproximadamente 10,52%, apresentavam genes *cry* específicos com potencial tóxico para dípteros e mortalidade para *A. aegypti* verificada por meio de bioensaios. Este resultado ainda foi descrito como alto comparado ao estudo de BRAVO et al. (1998) que obtiveram apenas 7,9% dos seus isolados apresentando genes específicos codificadores de proteínas tóxicas para dípteros. Na pesquisa de GOBATTO et al. (2010) também foi verificada praticamente o dobro da porcentagem dos isolados eficientes no controle de *A. gemmatalis* (60%) em relação ao controle de *C. quinquefasciatus* (30%).

3.2.2 Bioensaio contra lepidópteras

3.2.2.1 Bioensaio contra *A. gemmatalis*

Neste bioensaio, a realização da leitura após 48 horas e da leitura no 5º dia do bioensaio de todas as amostras (Tabela 4) permitiu avaliar a mortalidade final alcançada por cada uma das estirpes-teste (Tabela 5), mostrando que duas estirpes apresentaram mortalidade acima de 50% para larvas de 2º estágio de *A. gemmatalis*. Estas estirpes foram a Bt20, que apresentou mortalidade de 53,33%, e a Bt21, que provocou 76,67% de mortalidade nas larvas de *A. gemmatalis*. Apenas uma estirpe apresentou mortalidade abaixo de 10%. Os resultados também foram mostrados de modo a permitir uma visualização comparativa entre a mortalidade provocada pelas amostras e pelos controles (Figura 3).

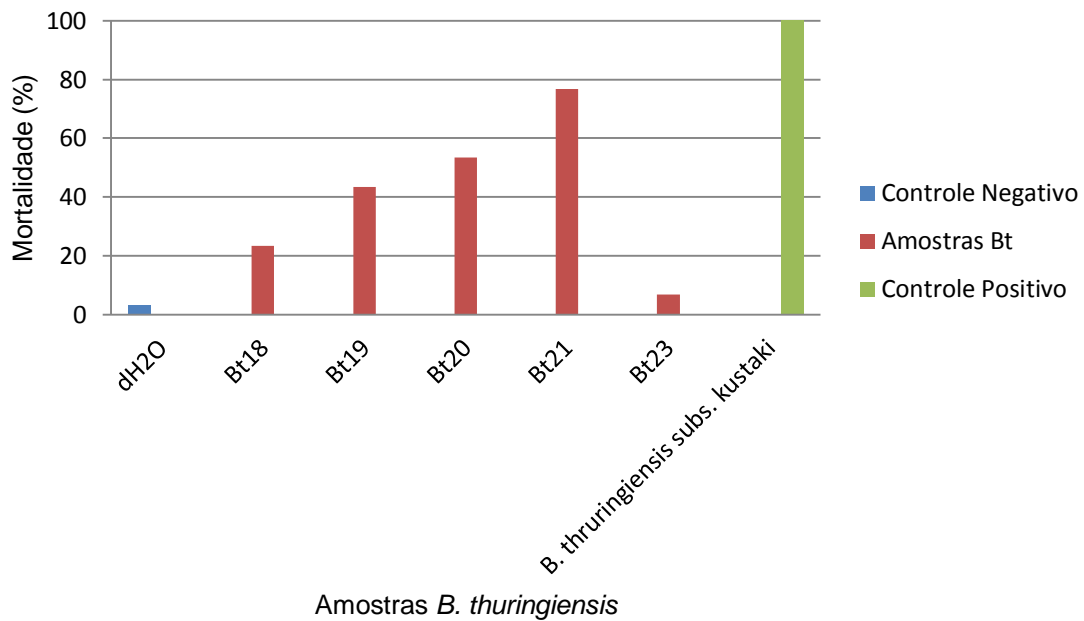
Tabela 4: Leituras do bioensaio com *A. gemmatalis* utilizando-se cinco estirpes de Bt e os controles positivo e negativo.

Amostras	Leitura 48 h		Leitura 5º dia	
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
Controle Negativo	30	0	29	1
Controle Positivo	0	30	-	-
Bt18	29	1	23	6
Bt19	23	7	17	6
Bt20	24	6	14	10
Bt21	15	15	7	8
Bt23	28	2	28	0

Tabela 5: Mortalidade obtida no bioensaio para *A. gemmatalis* utilizando-se cinco estirpes de Bt e os controles positivo e negativo.

Amostras	Avaliação		Mortalidade para <i>A. gemmatalis</i> (%)
	Vivas	Mortas	
Controle Negativo	29	1	3,33
Controle Positivo	0	30	100,0
Bt18	23	7	23,33
Bt19	17	13	43,33
Bt20	14	16	53,33
Bt21	7	23	76,67
Bt23	28	2	6,67

Figura 3. Bioensaio para *A. gemmatalis* utilizando-se 5 estirpes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).



3.2.2.2 Bioensaio contra *P. xylostella*

No bioensaio com *P. xylostella*, as leituras também realizadas após 48 horas e no 5º dia (Tabela 6) foram avaliadas para obtenção da mortalidade final, sendo que desta vez nenhuma das estirpes alcançou nas larvas de 2º estágio uma mortalidade superior a 50%; contudo, nenhuma estirpe apresentou também mortalidade abaixo de 10% (Tabela 7). Os resultados, assim como, os de *A. gemmatalis*, também foram mostrados de modo a permitir uma visualização comparativa da mortalidade provocada pelas amostras e pelos controles ao inseto-alvo (Figura 3).

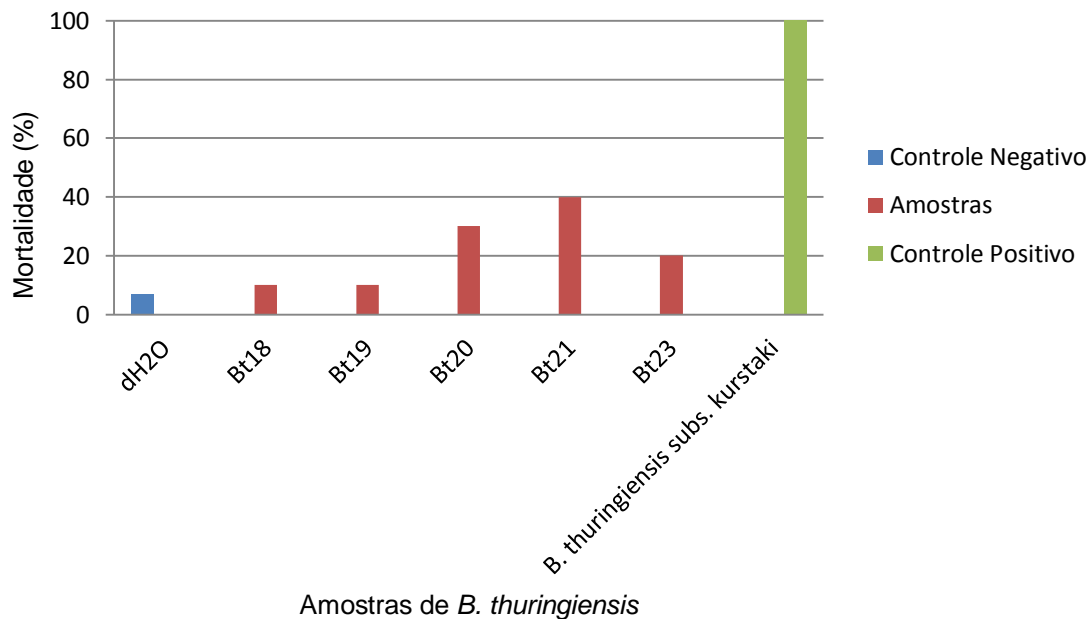
Tabela 6: Leituras do bioensaio com *P. xylostella* utilizando-se cinco estirpes de Bt e os controles positivo e negativo.

Amostra	Leitura 48 horas		Leitura 5º dia	
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
Controle negativo	30	0	28	2
Controle positivo	1	29	0	1
Bt18	30	0	27	3
Bt19	29	1	27	2
Bt20	27	3	21	6
Bt21	30	0	24	6
Bt23	30	0	18	12

Tabela 7: Mortalidade obtida no bioensaio para *P. xylostella* utilizando-se cinco estirpes de Bt e os controles positivo e negativo.

Amostras	Avaliação		Mortalidade para <i>P. xylostella</i> (%)
	Vivas	Mortas	
Controle Negativo	28	2	6,67
Controle Positivo	0	30	100,0
Bt18	27	3	10,0
Bt19	27	3	10,0
Bt20	21	9	30,0
Bt21	18	12	40,0
Bt23	24	6	20,0

Figura 4. Bioensaio para *P. xylostella* utilizando-se 5 estirpes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).



3.2.2.3 Bioensaio contra *S. frugiperda*

Os resultados do bioensaio para *S. frugiperda* foram apresentados de forma semelhante aos anteriores, sendo as leituras realizadas após 48 horas e no 7º dia do bioensaio (Tabela 8). A avaliação mostrou que duas estirpes provocaram mortalidade acima de 50% das larvas de 2º estágio de *S. frugiperda* (Tabela 9), sendo estas as mesmas que provocaram mortalidade acima de 50% para *A. gemmatilis*, porém com diferentes percentuais. A estirpe Bt20 alcançou a mortalidade de 66,67% das lagartas e a estirpe Bt21 alcançou 54,17% da morte das lagartas. Novamente, os resultados foram mostrados de modo a permitir uma visualização comparativa da mortalidade provocada pelas amostras e pelos controles (Figura 4).

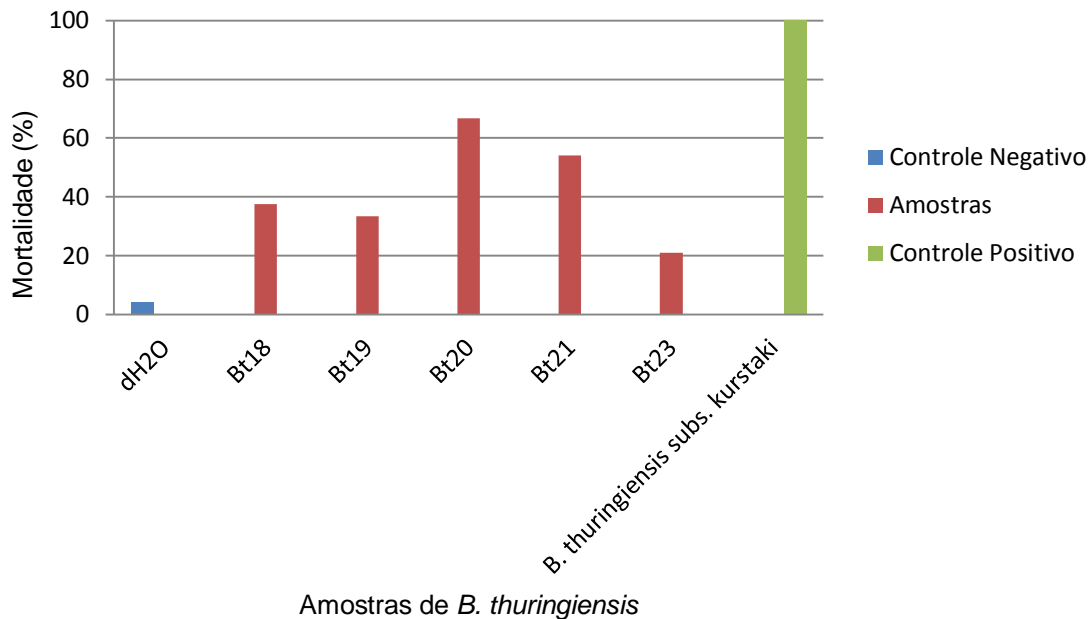
Tabela 8: Leituras do bioensaio com *S. frugiperda* utilizando-se 5 estripes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).

Amostras	Leitura 48 horas		Leitura 7 ^o dia	
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
Controle Negativo	23	1	23	0
Controle Positivo	2	22	0	2
Bt18	15	9	15	0
Bt19	18	6	16	2
Bt20	19	5	8	11
Bt21	15	9	11	4
Bt23	19	5	19	0

Tabela 9: Mortalidade obtida no bioensaio para *S. frugiperda* utilizando-se 5 estripes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).

Amostras	Avaliação		Mortalidade para <i>S. frugiperda</i> (%)
	Vivas	Mortas	
Controle Negativo	23	1	4,17
Controle Positivo	0	24	100,0
Bt18	15	9	37,5
Bt19	16	8	33,33
Bt20	8	16	66,67
Bt21	11	13	54,17
Bt23	19	5	20,83

Figura 5. Bioensaio para *S. frugiperda* utilizando-se 5 estirpes isoladas de Bt e os controles positivo (Bt) e negativo (água).



Os resultados encontrados nos bioensaios de lepidópteras confirmam o descrito por diversos autores de que o solo é uma promissora fonte de isolados de *B. thuringiensis* entomopatogênicos para esta ordem de insetos (BOBROWSKI et al., 2001; PRAÇA et al., 2004; SILVA et al., 2004). É relatado ainda que a maioria dos isolados naturais apresenta atividade inseticida efetiva no controle de larvas de lepidópteras (ALVES et al., 1998), encontrando-se maior dificuldade no isolamento de estirpes de *B. thuringiensis* com ação efetiva para dípteros ou coleópteros (MOHAMMEDI et al., 2006; ARMENGOL et al., 2007).

Além disso, pode-se observar também uma dificuldade geral de se encontrar isolados de *B. thuringiensis* efetivos, mostrando que os resultados do presente estudo foram satisfatórios ao isolar duas estirpes com potencial de mortalidade acima de 50% a duas espécies de lepidópteras e com todas as estirpes apresentando alguma mortalidade às três espécies de lepidópteras testadas. Tal dificuldade pode ser observada na pesquisa de Praça et al. (2003) na qual de 300 isolados identificados como *B. thuringiensis*, apenas 16 estirpes apresentaram mortalidade para um ou mais dos insetos testados, e destas, 6 apresentaram efetividade para mais de uma ordem de insetos e apenas 2 apresentaram mortalidade às 5 espécies testadas - *A. gematallis* e *S. frugiperda* (lepidópteras), *C.*

quinquefasciatus e *A. aegypti* (dípteros) e *Anthonomus grandis* (coleóptero). Mostrando ainda a dificuldade de se encontrar uma estirpe que apresente efeito tóxico para mais de uma ordem, sendo que, a cada nova identificação de *B. thuringiensis*, pode se observar que a variabilidade que gerou certa estirpe a torna entomopatogênica a um tipo específico de animal, reafirmando sua grande diversidade na natureza (SILVA, 2008).

Vale lembrar que as proteínas deste bacilo são altamente específicas (HERRERO et al., 2001) e se ligam a receptores específicos do intestino (COSTA, 2009). Assim, os receptores são fatores essenciais na especificidade, toxicidade e resistência apresentada pelos insetos às proteínas (KNAAK et al., 2010). No intestino das larvas de insetos a ação entomopatogênica ocorre por uma clivagem proteolítica que transforma tais proteínas (protoxina) em uma toxina que induz a lise da célula hospedeira pela perda de líquido (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Algumas alterações nos intestinos larvais provocadas pela intoxicação resultante das proteínas do *B. thuringiensis* são: aumento no volume das células do epitélio, rompimento das microvilosidades, vacuolização do citoplasma, modificações em organelas citoplasmáticas e hipertrofia celular (KNAAK et al., 2010).

As delta-endotoxinas, ao se ligarem aos receptores do intestino, geram condições para propiciar a germinação dos esporos, provocando uma septicemia na larva e a morte desta que passa a servir de nutriente para o crescimento vegetativo da bactéria (KNOWLES 1994; COSTA, 2009). O inseto também pode morrer por inanição, pois após ser infectado o inseto logo para de se alimentar (HOFTE; WHITELEY, 1989; COPPING; MENN, 2000). Tais informações podem ser observadas nas Tabelas 4, 6 e 8, que mostram que, mesmo depois da dieta trocada não apresentar tratamento bacteriano, ainda ocorre mortalidade do inseto-alvo, que pode ser em amplitude maior ou menor que a provocada nas primeiras 48 h.

3.3 Ensaio para avaliação de inibição

No teste para avaliação de inibição de microrganismos, em que as amostras de Bt isoladas neste estudo foram confrontadas entre si, apenas a estirpe Bt19 foi capaz de inibir outros isolados de *B. thuringiensis*. Foi observado que esta estirpe foi

capaz de produzir um halo inibitório para as estirpes Bt20 e Bt23, impedindo o avanço do crescimento das mesmas. Este resultado é coerente com o relato de que as bactérias são capazes de produzir substâncias com potencial de inibição tanto do próprio crescimento quanto do crescimento de outros microrganismos, sendo assim, muitas espécies de bactérias do gênero *Bacillus* sp. são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana (JACK et al., 1995). Contudo, é necessário que se amplifique tal estudo confrontando tal estirpe com demais bactérias, principalmente, com outras espécies de *Bacillus* sp.

3.4 Extração de DNA e caracterização molecular por PCR

Todas as amostras isoladas (Bt18, Bt19, Bt20, Bt21 e Bt23) apresentaram amplificação por PCR do gene *cry1* testado, com o aparecimento de bandas no tamanho de 558 pb, o que representa um resultado coerente, pois as toxinas Cry1, Cry2 e Cry9 são descritas como efetivas para a ordem Lepidoptera (CRICKMORE et al., 1998; ARMENGOL et al., 2007) Além disso, ocorrem diversas variações na distribuição e no conteúdo dos genes da classe *cry1*, que são comumente encontrados nas distintas coleções de *B. thuringiensis* (FERRANDIS et al., 1999), trazendo a necessidade de se testar as diversas variações *cry1* para caracterização mais específica das amostras.

3.5 Extração de proteína e visualização em gel de poliácridamina – SDS

Todas as amostras (Bt18, Bt19, Bt20, Bt21 e Bt23) apresentaram perfis semelhantes no gel de proteína (Figura 5). Os polipeptídios de 270 e 20 kDa observados são provavelmente de proteínas estruturais comuns a todas as estirpes de *B. thuringiensis*, podendo ser proteínas pertencentes à membrana ou parede celular (CAVALEIRO et al., 2005). As estirpes também apresentaram, mesmo que de forma discreta, bandas equivalentes a 65 kDa, que pode ser a responsável pela mortalidade em lepidópteros neste estudo e que já foi relacionada à presença dos genes *cry1* por diversos trabalhos (LI et al., 2002; MONNERAT et al., 2002; URIBE et al., 2003).

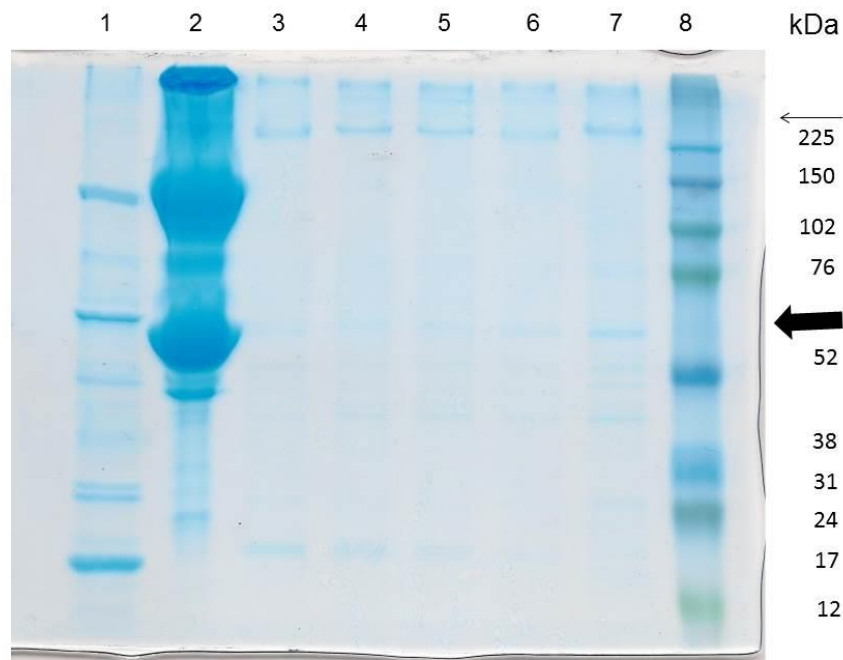


Figura 6. Perfil protéico obtido por SDS-PAGE 10% de cinco estirpes de Bt e os padrões (Bti e Btk). 1. Bti; 2. Btk; 3. Bt23; 4. Bt21; 5. Bt20; 6. Bt19; 7. Bt18; 8. Marcador Full Range Rainbow Protein molecular Weight – Gibco BRL.

4 Conclusão

Para o presente estudo, foram coletadas 20 amostras de solo de diferentes localidades do Distrito Federal. Dentre as amostras, 19 colônias de *Bacillus* sp. foram isoladas e destas, 5 foram identificadas como *B. thuringiensis* por microscopia de contraste de fase. Bioensaios realizados contra dípteros – *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* - mostraram que as estirpes isoladas não apresentaram nenhuma mortalidade aos insetos-alvo pertencentes a esta ordem. Contudo, todas as amostras apresentaram alguma mortalidade às espécies de lepidópteras – *A. gemmatalis*, *P. xylostella* e *S. frugiperda* - testadas neste estudo, sendo que duas estirpes, Bt20 e Bt21, apresentaram mortalidade acima de 50% para *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Apenas a estirpe Bt19 produziu halo de inibição no teste de confronto entre as estirpes isoladas, inibindo o crescimento das estirpes Bt20 e Bt23. Todas as estirpes amplificaram para o gene geral *cry1* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e todas apresentaram, mesmo que discreta, a banda de peso 65 kDa, relacionando os dados da caracterização molecular aos do bioensaio, pois os

genes *cry1* e as proteínas 65 kDa já foram responsabilizados em diversos estudos por provocar a mortalidade em lepidópteras.

O isolamento de novas estirpes de *B. thuringiensis* é um passo muito importante no descobrimento de agentes no controle biológico tanto de pragas da agricultura quanto de diversos vetores de doenças em humanos, além do controle de diversas outras classes de animais e seu promissor uso como agente antimicrobiano. Portanto, o isolamento, seguido da caracterização biológica e molecular das estirpes encontradas, é fundamental para o desenvolvimento de novos produtos a base desse bacilo. Com isso, é necessário o aprofundamento dos estudos com as estirpes já isoladas nesta pesquisa, como avaliação da CL50 para as estirpes Bt20 e Bt21 em lepidópteras, mais ensaios de inibição com a estirpe Bt19 e caracterização molecular mais profunda de todas as estirpes, como a identificação de genes *cry1* específicos. Além de tudo, é essencial a continuidade na busca por novos isolados de *B. thuringiensis*.

Biological and molecular characterization of strains of *Bacillus thuringiensis*.

Abstract:

Bacillus thuringiensis is a bacterium Gram positive usually found in soil. It's an important biological control agent of pests in agriculture and of several animals vectors of diseases in humans, besides promising in the production of antimicrobial substances. Its toxicity occurs by protein inclusions produced during sporulation which has a form of crystals; these proteins are highly specific and encoded by *cry* genes. The aim of this work was to isolate strains of *B. thuringiensis* from soil samples of the Distrito Federal, Brasília, Brazil; and perform its biological and molecular characterization. The isolation occurred by applying thermal shock and identified by phase contrast microscopy, obtaining 5 strains of *B. thuringiensis*. Selective bioassays were performed using the isolated strains against dipteran species, strains which showed no toxic effects, and against lepidopteran species to which the strains showed toxic effect, while two strains, Bt20 and Bt21, caused mortality above 50% in two species of this order of insects. The strain Bt19 was able to inhibit the growth of other two strains. All strains were amplified by PCR for the *cry1* gene and showed the protein 65-kDa in protein gel. It is essential that new isolations could be done and that the studies with the strains already isolated continue in search of new strains of *B. thuringiensis* and more knowledge about these for developing new products for efficient biological control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Biological control. *cry* genes. Antimicrobial activity.

Referências Bibliográficas

- ALVES, M.C. et al. Identificação e caracterização de genes vip e cry coleóptero-específicos em isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v.46, n.9, p.1053-1060, setembro, 2011.
- ALVES, SB., MOINO, JR. and ALMEIDA, JEM. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In ALVES, SB. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ. p.1143-1163, 1998.
- ARMENGOL, G., ESCOBAR, MC., MALDONADO, ME. and ORDUZ, S. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 102, no. 1, p. 77-88, 2007.
- ARRIETA, G.; ESPINOZA, A.M. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. **Revista de Biología Tropical**, v.54, p.13-27, 2006
- AZAMBUJA, A.O. de; ALLES, G.C.; FRITZ, L.L.; RECHE, M.H.R.; FIUZA, L.M. Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.38, p.14-23, 2009.
- BOBROWSKI, VL., PASQUALI, G., BODANESE-ZANETTINI, MH. and FIUZA, LM. Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 32, no. 2, p. 105-109, 2001.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4965-4972, 1998.
- CAMPANINI, EB. et al. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. **Brazilian Journal of Biology**, 2012, vol. 72, no. 2, p. 243-247.
- CASTRO, O.M.; PRADO, H.; SEVERO, A.C.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. **Scientia Agricola**, v.50, p.212-219, 1993.
- CAVALEIRO, H. et al. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Nº 87. ISSN 1676-1340, 2005.

CHIN, K.J.; DITTMAR, H.; ULF, H.; WERNER L.; PETER H.J. Characterization and identification of numerically abundant culturable bacteria from the anoxic bulk soil of rice paddy microcosm. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v.65, p. 5042-5049, 1999.

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

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, December 2001.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, London, v.56, p.651-676, 2000.

COSTA, J.R.V. da; ROSSI, J.R.; MARUCCI, S.C.; ALVES, E.C. da C.; VOLPE, H.X.L.; FERRAUDO, A.S.; LEMOS, M.V.F.; DESIDÉRIO, J.A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, p.757-766, 2010.

COSTA, Juliana R.V. PREDIÇÃO in vitro DA ATIVIDADE TÓXICA DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER E EFEITO SINERGÍSTICO CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” **FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE JABOTICABAL**. - JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL, 2009.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, DR., SCHNEPF, E., RIE, J. van, LERECLUS, D., BAUM, J., BRAVO, A. and DEAN, DH. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 62, no. 3, p. 807-813, 1998.

FERRANDIS, M.D.; JUÁREZ-PÉREZ, V.M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p.179-185, 1999.

FIUZA, L.M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biociência e Desenvolvimento**, v.38, p.32-35, 2010.

GOBATTO, V. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 70, no. 4, p. 1039-1046, 2010.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.3, p.1085-1089, 2001.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p.242-255, 1989.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.

JÚNIOR, W. W. et al. Koneman, **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KNAAK, N. et al. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae) - **Brazilian Journal of Biology**, 2010, vol. 70, no. 3, p. 677-684.

KNOWLES, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v.24, n.2, p.275-308.

LECADET, M. M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 58, p. 840-849, 1991.

LI, MS., JE, YH., LEE, IH., CHANG, JH., ROH, JY., KIM, HS., OH, HW. and BOO, KS., 2002. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new δ -endotoxin gene. **Current Microbiology**, vol. 45, no. 4, p. 299-302.

LÓPEZ P. S. A.; CERÓN S. J. A. Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis*. Toxins: A Review. **Acta biol. Colomb.**, V. 12, nº. 2, p. 19 – 32, 2007.

MADIGAN, Michel T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock** – tradução e revisão técnica Cynthia Maria Kiaw, - São Paulo: Prentice Hall, 2004. 10ª ed. p. 383-384.

MARTÍNEZ, C., IBARRA, JE. and CABALLERO, P., 2005. Association analysis between serotype, Cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 90, no. 2, p. 91-97.

MIORELLI, D.; CASTILHOS, D.D.; GOMES, A. SILVA, PAULETTO, E.A. Biomassa e atividade microbiana de um planossolo sob diferentes sistemas de manejo. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, 7., 2005, Pelotas. Anais. Pelotas: 2005. v.1, 4p.

MOHAMMEDI, S., SUBRAMANIAN, SB., YAN, S., TYAGI, RD. and VALÉRO, JR., 2006. Molecular screening of *B. thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. **Process Biochemistry**, vol. 41, no. 4, p. 829-835.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 2000. V. 3, p. 163 – 200.

MONNERAT, R.G; SILVA-WERNECK, J.O. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 5p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 10).

MONNERAT, RG., SANTOS, RC., BARROS, PC., BATISTA, AC. and BERRY, C., 2002. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas do algodão. Brasília: **Embrapa**. 4 p. **Circular técnica**, n. 10.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; BERRY, C. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, [S. l.], v. 41, p. 291-295, 2007.

MORINAGA, C. T.; PRAÇA, L. B.; MELATTI, V. M.; MEDEIROS, P. T.; SOARES, E. M.; DUMAS, V. F.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* coletadas em solos do oeste baiano. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 194, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, p.699-702, 2003.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, V. 37, nº. 6, p. 813 – 816, 2003.

POLANCZYK, Ricardo A; SILVA, Rogério F. P.da; FIUZA, Lidia M. ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER A PARTIR DE MOSTRAS DE SOLOS E SUA PATOGENICIDADE PARA *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 209-214, abr-jun, 2004.

PRAÇA, L. B. et al. *Bacillus thuringiensis* strains effective against insects of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. **Pesquisa Agropecuária**. Brasília, V. 39, nº. 1, jan. 2004.

PRAÇA, L.B. et al. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Nº 41. ISSN 1676 - 1340 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea. **J Microbiol Biotechnol**. 2007 Apr;17(4):547-59.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. van; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.775-806, 1998.

SCHULZ D., BONELLI R.R., BATISTA C.R.V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alim. Nutr. Araraquara**. v.16, n.4, p.403-411 , out./dez. 2005.

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.

SILVA, SMB., SILVA-WERNECK, JO., FALCÃO, R., GOMES, AC., FRAGOSO, RR., QUEZADO, MT., OLIVEIRA-NETO, OB., AGUIAR, JB., SÁ, MFG., BRAVO, A. and MONNERAT, RG., 2004. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *S. frugiperda* and other insects pests. **Journal of Applied Entomology**, vol. 128, no. 2, p. 102-107.

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.

URIBE, D., MARINEZ, W. and CERÓN, J., 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 82, no. 2. p. 119-127.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; SOUZA, M.T. de. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.201-230.

ANEXO A – Autorização SisBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 30683-1	Data da Emissão: 18/08/2011 21:13
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Fernanda Guimarães Bernardes	CPF: 036.215.871-10
------------------------------------	---------------------

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
REINO	Bacteria

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14646632



ANEXO B – Dietas artificiais para os bioensaios com *Anticarsia gemmatalis* e
Spodoptera frugiperda

*Dieta para bioensaio com *A. gemmatalis* – 1º dia do bioensaio

- Componentes autoclaváveis:

Feijão cru triturado 31,2g

Levedo de cerveja 15,6g

Gérmen de trigo – 25,0g

Proteína de soja – 25,0g

Ágar – 10,0g

Caseína – 12,5g

Água destilada – 450 mL

- Componentes não autoclaváveis:

Ácido ascórbico – 2,2g

Solução vitamínica – 2,5 mL

*Dieta de TROCA para *A. gemmatalis* – após 48h do início do bioensaio

- Componentes autoclaváveis:

Feijão cru triturado 24,3g

Levedo de cerveja 12,2g

Gérmen de trigo – 19,4g

Proteína de soja – 19,4g

Ágar – 7,8g

Caseína – 9,7g ou Leite em pó 28,9g

Água destilada – 350 mL

- Componentes não autoclaváveis:

Ácido ascórbico – 1,7g

Solução vitamínica – 1,9 mL

Ácido sórbico – 0,6g

Nipagin – 0,9g

Formol 40% - 1,2 mL

*Dieta para bioensaio com *S. frugiperda* – 1º dia do bioensaio

- Componentes autoclaváveis:

Feijão cru triturado 140,4g

Levedo de cerveja 42,9g

Gérmen de trigo – 67,4g

Proteína de soja – 19,4g

Ágar – 17,0g

Água destilada – 1000 mL

- Componentes não autoclaváveis:

Ácido ascórbico – 4,3g

*Dieta de TROCA para *S. frugiperda* – após 48h do início do bioensaio

- Componentes autoclaváveis:

Feijão cru triturado 165g

Levedo de cerveja 50,5g

Gérmen de trigo – 79,2g

Ágar – 30,0g

Água destilada – 1200 mL

- Componentes não autoclaváveis:

Ácido ascórbico – 5,1g

Ácido sórbico – 1,65g

Nipagin – 3,15g

Formol 10% - 12,65 mL

ANEXO C – Locais, dados de coleta e isolamento

Tabela 10. Dados de coleta com o respectivo resultado de isolamento da amostra.

Local	Data	Latitude	Longitude	Isolamento de <i>Bacillus sp.</i>
Asa Sul I	20/09/2011	15°47,7149'S	47°53,5782'O	Positivo – <i>B. thuringiensis</i>
Asa Norte I	20/09/2011	15°44,2992'S	47°53,6040'O	Positivo – <i>B. thuringiensis</i>
Asa Sul II	23/09/2011	15°47,8023'S	47°53,9690'O	Positivo – <i>B. thuringiensis</i>
Asa Sul III	23/09/2011	15°49,1802'S	47°52,4585'O	Negativo
Asa Sul IV	23/09/2011	15°49,6994'S	47°55,2568'O	Negativo
Lago Norte I	23/09/2011	15°44,0647'S	47°53,0813'O	Positivo – <i>B. thuringiensis</i>
Asa Sul V	13/10/2011	15°48,5640'S	47°54,9613'O	Negativo
Lago Norte II	13/10/2011	15°44,0643'S	47°53,0796'O	Negativo
Asa Norte II	13/10/2011	15°44,5592'S	47°53,1502'O	Negativo
Asa Norte Embrapa I	25/01/2013	15°43,4427'S	47°53,5916'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte Embrapa II	25/01/2013	15°43,4314'S	47°54,0015'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte Embrapa III	25/01/2013	15°43,4195'S	47°54,0818'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte Embrapa IV	25/01/2013	15°43,4078'S	47°54,1372'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte Embrapa V	14/02/2013	15°43,5316'S	47°54,0114'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte Embrapa VI	14/02/2013	15°43,5392'S	47°54,0401'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte Embrapa VII	14/02/2013	15°43,5453'S	47°54,0666'O	Negativo
Asa Norte UnB I	05/04/2013	15°45,5291'S	47°51,5735'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte UnB II	05/04/2013	15°45,5164'S	47°52,0185'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>
Asa Norte UnB III	05/04/2013	15°46,2383'S	47°51,5786'O	Negativo
Asa Norte UnB IV	05/04/2013	15°46,2466'S	47°52,0166'O	Positivo – <i>Bacillus sp.</i>