



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

TALITA LACERDA DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS EM *Bacillus thuringiensis*

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito ao curso de biomedicina do UniCEUB sob orientação do Professor Paulo Roberto Martins Queiroz

BRASÍLIA
2019

Produção de bacteriocinas em *Bacillus thuringiensis*

Talita Lacerda de Oliveira ¹
Paulo Roberto Martins Queiroz²

Resumo

Bacillus thuringiensis (Bt) é um bacilo Gram positivo que produz bacteriocinas e tem ação bacteriolítica ou bacteriostática sobre microrganismos patogênicos. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos que atuam contra bactérias Gram positivas e negativas e diferem entre si quanto à composição de aminoácidos, biossíntese, transporte e modo de ação. O objetivo desse projeto foi isolar estirpes de *Bacillus thuringiensis* a partir de amostras de solos do Distrito Federal e verificar a produção de bacteriocinas com potencial de inibição de microrganismos. Foram isoladas e caracterizadas nove estirpes de *Bacillus thuringiensis* e cada estirpe foi testada quanto ao potencial de inibição por meio de bioensaios de confronto por estrias e por Well Diffusion, contra bactérias patogênicas e contra as estirpes de Bt isoladas. Bacteriocinas produzidas por estirpes de *Bacillus thuringiensis* podem ser utilizadas na inibição do crescimento de microrganismos, indicando um potencial de uso biotecnológico dessa proteína, visando o desenvolvimento de produtos de interesse biomédico.

Palavras-Chave: “Bacteriocinas”, “Biocontrole”, “Well Diffusion”, “Bioensaios”

Production of bacteriocins in *Bacillus thuringiensis*

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram-positive bacillus that produces bacteriocins and has bacteriolytic or bacteriostatic action on pathogenic microorganisms. Bacteriocins are antimicrobial peptides that act against Gram positive and negative bacteria and differ in amino acid composition, biosynthesis, transport and mode of action. The objective of this project was to isolate strains of *Bacillus thuringiensis* from soil samples from Distrito Federal and verify the production of bacteriocins with potential for microorganism inhibition. Nine strains of *Bacillus thuringiensis* were isolated and characterized, and each strain was tested for potential inhibition by groove confrontation and Well Diffusion bioassays against pathogenic bacteria and isolated strains of Bt. Bacteriocins produced by strains of *Bacillus thuringiensis* can be used to inhibit the growth of microorganisms, indicating a potential of biotechnological use of this protein, aiming the development of products of biomedical interest.

Key-words: “Bacteriocins”, “Biocontrol”, “Well Diffusion”, “Bioassays”

¹Estudante de Biomedicina do UniCEUB

²Professor do curso de Biomedicina do UniCEUB

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

Muitas pesquisas já foram realizadas para conseguir identificar os diferentes tipos de bacteriocinas que *B. thuringiensis* é capaz de sintetizar. Segundo Salazar-Marroquín (2016)

dentre as bacteriocinas já identificadas muitas apresentaram potencial de inibição. A maior parte dessas é de amplo espectro e inibe várias espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Fuente-Salcido (2012) confirma que cada bacteriocina atua contra microrganismos específicos.

Em virtude desse potencial biotecnológico é importante realizar a correta identificação das estirpes de *B. thuringiensis*. As espécies de *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* são semelhantes morfológicamente entre si. Os três são bacilos Gram positivos (espessa camada de peptidoglicano) e aeróbios estritos (SNEATH; HOLT, 1986; DROBNIEWSKI, 1993; SOBERÓN; BRAVO, 2010). As três espécies 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 protéicos laterais nos esporos dos *B. thuringiensis*, o que não se evidencia nos outros bacilos. Além disso, podem ser realizadas provas bioquímicas, observação do endósporo de cada espécie e outros testes para diferenciá-los possibilitando o isolamento do *B. thuringiensis* (KONEMAN et al., 2008).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi isolar estirpes de *Bacillus thuringiensis* com potencial de inibição de microrganismos através da coleta de solos de cerrado, realizar a caracterização morfológica dos microrganismos encontrados, identificar as estirpes produtoras de bacteriocinas e avaliar a ação da bacteriocina contra diferentes estirpes de Bt e outros microrganismos.

2. METODOLOGIA

2.1. Isolamento, Cultivo e Caracterização das Estirpes

Foram coletadas amostras de solo do cerrado do Distrito Federal, de locais aleatórios, cada amostra, contendo 1 g de solo. Todas as amostras foram homogeneizadas por turbilhamento em 9 mL de solução salina 0,8%. Essas foram transferidas a 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) durante 5 minutos.

A amostra que sofreu o choque térmico foi diluída 10 e 100 vezes em solução salina 0,8%. Com um micropipetador foi retirada uma alíquota de 100 µL da diluição de 100 vezes para distribuição em uma placa de Petri contendo ágar LB (Tryptona 1 g, Extrato de Levedura 0,5 g, NaCl 1 g, Ágar 20 g, pH 7,2 e água destilada q.s.p 1000 mL) com penicilina G, 100 mg/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). Após o período de crescimento bacteriano as colônias obtidas foram avaliadas quanto a sua morfologia para a seleção específica de *B. thuringiensis*.

Após 48 horas de incubação, foi feito um esfregaço de cada uma das colônias. A lâmina foi passada de 3 a 4 vezes pela chama do bico de Bunsen. Em seguida, as lâminas tiveram 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 minuto. Ao final, a lâmina foi lavada com água destilada. O esfregaço foi coberto com solução de iodeto de Gram (1 g de iodo, 2 g de iodeto de potássio, 300 mL de água destilada) por 1 minuto seguido por lavagem com água destilada. Após a coloração, a lâmina foi descorada com acetona: álcool (na proporção 80:20) até que a cor violeta desaparecesse. Em seguida a lâmina foi lavada com água novamente e foi adicionado o contracorante safranina (safranina 2,5% em etanol 95% (p/vol) por um minuto. A lâmina foi lavada com água corrente e secou em temperatura ambiente. Depois de corada a lâmina foi observada no microscópio óptico na objetiva de 100x (KONEMAN *et al.*, 2008).

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

2.2. Extração das bacteriocinas e avaliação da atividade

Após a obtenção das estirpes de *B. thuringiensis* elas essas foram inoculadas em 50 mL de meio LB e mantidas a 28 °C por 16 horas sob agitação. As culturas na fase exponencial

de crescimento foram centrifugadas a 7500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A atividade das bacteriocinas foi avaliada pelo método de diluição crítica.

Em placas de microtitulação (Microwel Plate 96F), os sobrenadantes foram diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. Alíquotas de 10 µL de cada diluição foram depositadas no meio LB ágar contido em placas de Petri e previamente inoculado com uma cultura da estirpe B06. Após incubação a 28 °C durante 24 horas, os meios foram analisados quanto à formação de halos de inibição.

As placas de Petri contendo a cultura indicadora foram preparadas a partir da cultura de outra estirpe de *B. thuringiensis* 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 minutos, os meios foram incubados a 28 °C durante 2 horas antes de sua utilização.

2.3. Cinética de produção de bacteriocinas

Após a obtenção das estirpes de *B. thuringiensis* estas foram inoculadas em 50 ml de meio LB e mantidas a 28 °C por 72 horas sob agitação de 80 rpm. Em intervalos de 2 horas, amostras de 1 ml foram coletadas do meio LB sob condições estéreis. Esse material foi centrifugado a 12.000 rpm. Em seguida, as atividades das bacteriocinas foram avaliadas pelo método de diluição crítica, conforme descrito anteriormente.

3. RESULTADOS

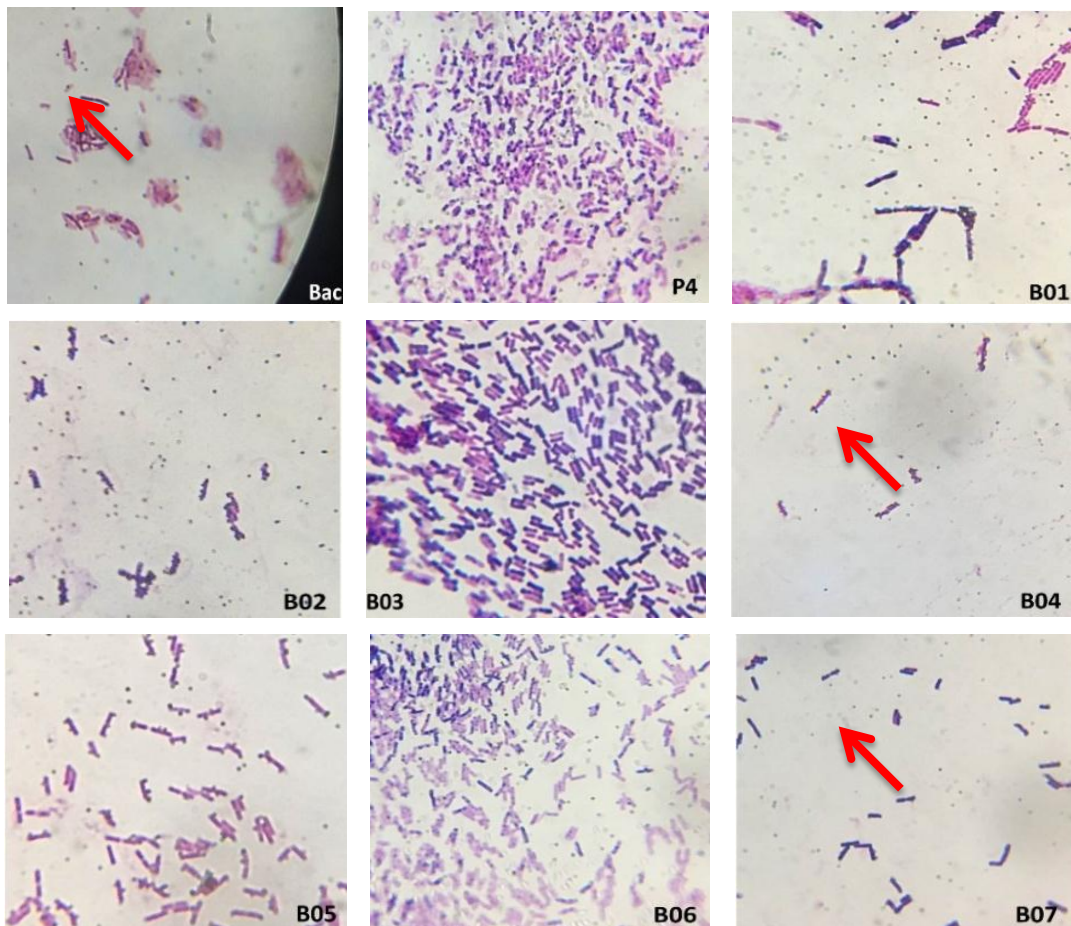
3.1. Isolamento, Cultivo e Caracterização das Estirpes

Do total de amostras coletadas foi possível selecionar nove estirpes diferentes. Elas receberam as denominações de Bac, P4, B01, B02, B03, B04, B05, B06 e B07. Em seguida, realizou-se a caracterização morfológica por meio da coloração de Gram. Observou-se que das nove estirpes identificadas por microscopia todas apresentaram a forma bacilar e a coloração de Gram indicou que os bacilos eram Gram positivos.

A aplicação da técnica de coloração associada à microscopia permitiu identificar a forma bacilar da célula vegetativa e o esporo, (Figura 1) sugerindo que as estirpes pertencessem à espécie *B. thuringiensis*. A exclusão das outras duas espécies de *Bacillus* (*B. cereus* e *B. anthracis*) aconteceu na fase anterior à coloração, pois o choque térmico que é aplicado na fase de isolamento do Bt é capaz de eliminar essas duas espécies de *Bacillus* e a confirmação de *B. thuringiensis* foi observada pela presença do cristal. Reforça-se que, as

bacteriocinas são proteínas que são secretadas para o meio de cultura e, dessa forma, não são visualizadas nas colorações ou na microscopia.

Figura 1: Coloração de Gram das nove estirpes de *Bt* isoladas. Forma bacilar indicado pela seta vermelha.



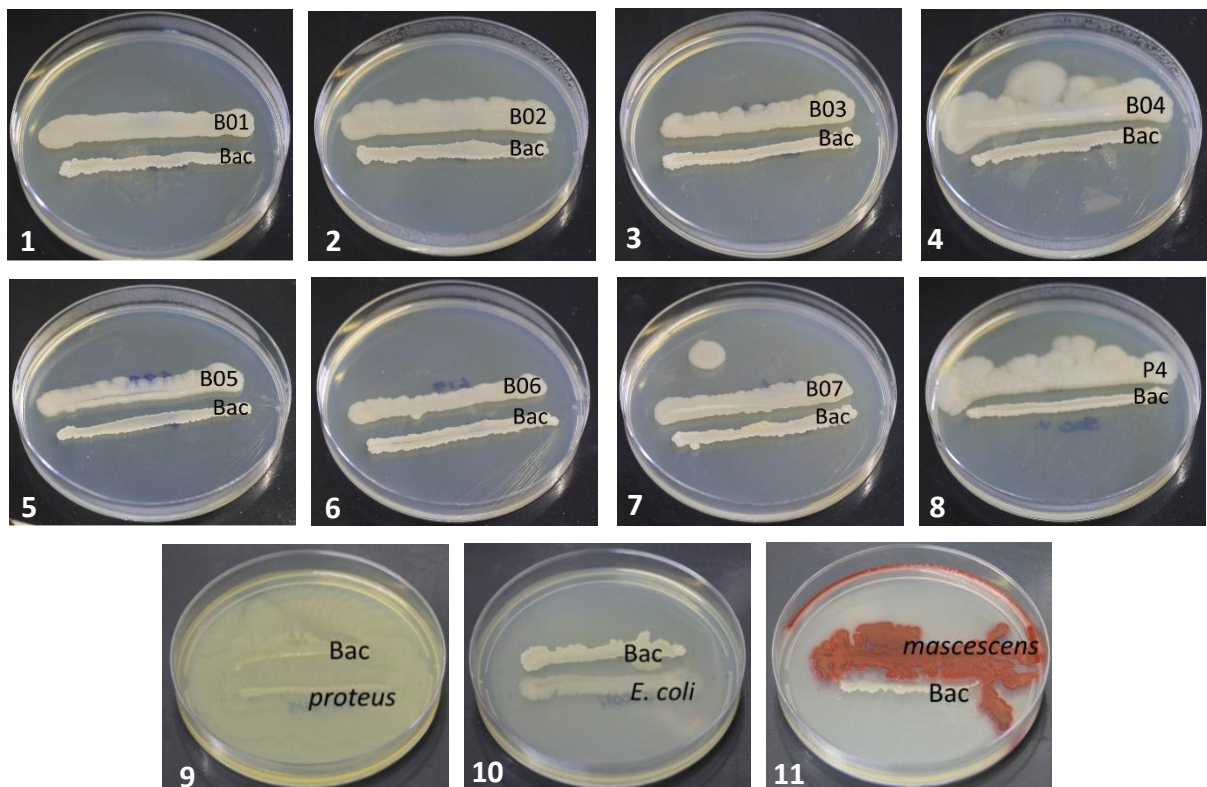
Fonte: elaborado pela autora

3.2. Extração das bacteriocinas e avaliação da atividade

Após a confirmação do isolamento das estirpes de *Bt* foi realizado um bioensaio de confronto por estrias para verificar o potencial de inibição microbiana de cada uma das bactérias isoladas conforme observado nas figuras 2 e 3. O ensaio foi mantido a 28 °C por 24 h a 72 h e, após o tempo determinado, foi possível observar o potencial de produção de bacteriocina de cada estirpe e selecionar a melhor estirpe de *Bt* quanto à capacidade de inibição. A visualização do potencial de inibição pode ser observada através da distância que as estrias se mantiveram uma da outra e também através do potencial da bactéria inibida crescer para o lado oposto da que está inibindo, como pode ser observado na figura 2. A estirpe que apresentou um melhor potencial de inibição no bioensaio foi a Bac. Apesar do potencial da

Bac inibir as outras estirpes de *Bt* ela não foi capaz de inibir microrganismos patogênicos, pois como pode ser observado na figura 2 as bactérias patogênicas cresceram por cima da estirpe Bac.

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



Fonte: Elaborado pela autora

A distância que as estirpes se mantiveram uma das outras no bioensaio de estrias indica o potencial bacteriostático do *Bt*, ou seja, o potencial de inibição da Bac contra todas as outras estirpes de *Bt*, como pode ser observado na tabela 1. As distâncias variaram de 3 a 7mm, mostrando que cada estirpe pode ser inibida com um potencial diferente. A inibição acontece quando a bactéria inibida não consegue entrar em contato com a outra e cresce para o lado oposto. O confronto realizado com as bactérias patogênicas *Proteus* sp e *Serratia marcescens* indicaram que não houve a inibição e a razão para isso pode ser o tipo de bacteriocina que a Bac produziu. No confronto com a *Escherichia coli* o resultado foi inconclusivo, pois não houve contato entre ela e a Bac.

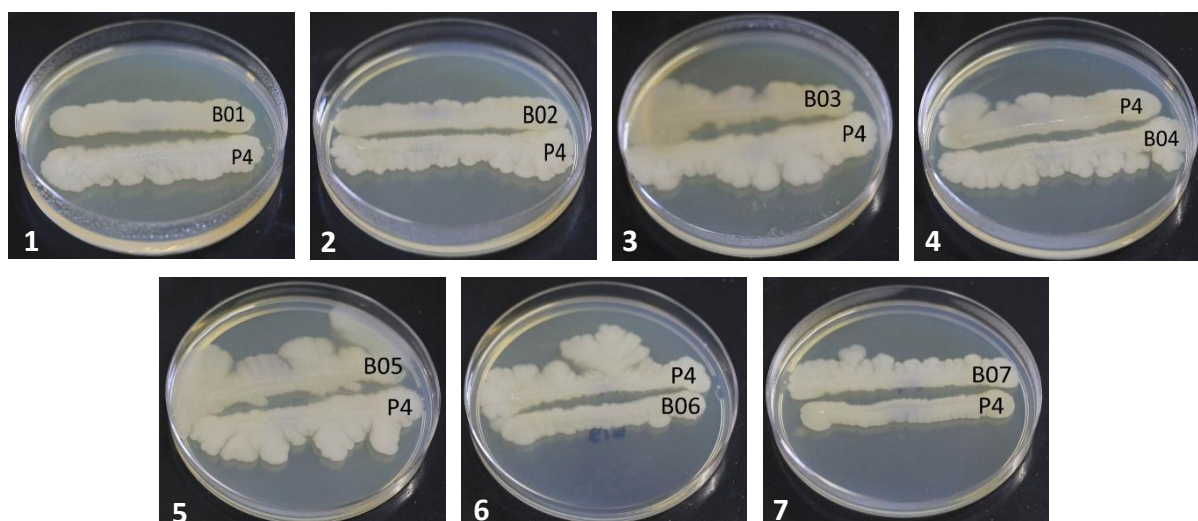
Tabela 1: Medida da distância entre as estrias do bioensaio entre Bac e outras estirpes de Bt e bactérias patogênicas.

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

Fonte: Elaborado pela autora

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

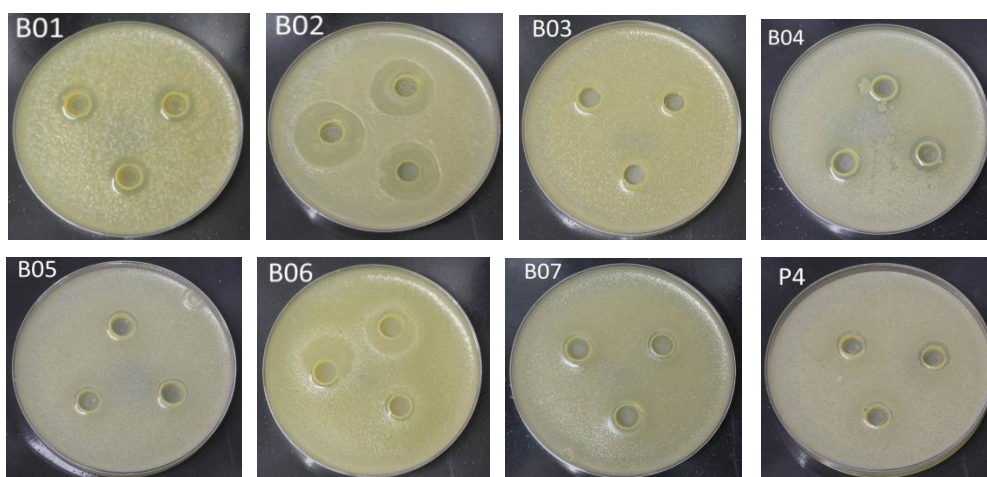
Figura 3: Ensaio de confronto entre a estirpe P4 e as outras estirpes de Bt.



Fonte: Elaborado pela autora

Após o bioensaio de confronto por estria foi selecionada a estirpe com maior potencial de inibição (Bac) e ela foi utilizada no bioensaio Well Diffusion, ensaio que foi mantido a 28 °C por 24 h e depois foi observada a formação do halo, que indica melhor o potencial de inibição (figura 4). A padronização do halo é difícil de ser realizada, porém esse ainda é considerado o melhor método para a visualização da produção de bacteriocina, pois nele é possível observar a inibição da bactéria que foi inoculada na placa. A estirpe Bac inibiu as estirpes B01, B02, B04, B06 e P4. Dentre essas estirpes que foram inibidas, o maior halo de inibição foi observado no bioensaio contra B02 e B06.

Figura 4: Ensaio de confronto entre Bac e as outras estirpes de BT.



Fonte: Elaborado pela autora

O tamanho do halo formado no bioensaio well diffusion de Bac contra outras estirpes indica o potencial que ela tem de produzir bacteriocina contra as outras estirpes testadas, como pode ser observado na tabela 2.

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

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

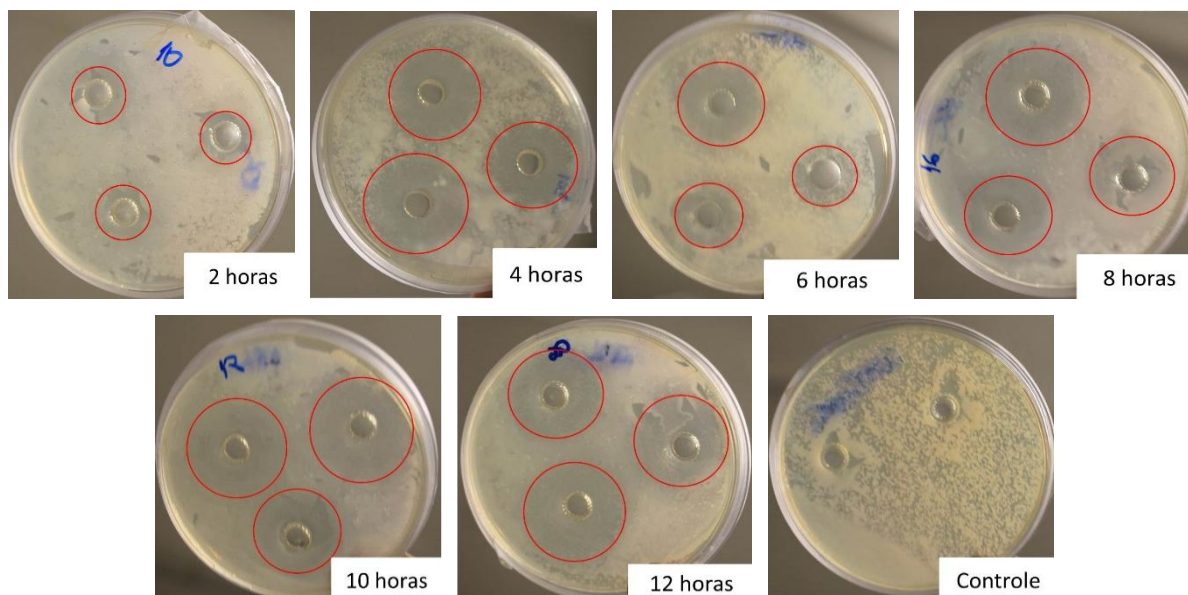
Fonte: Elaborado pela autora

3.3. Cinética de produção de bacteriocinas

Para confirmar a produção de bacteriocina foi realizada uma cinética de crescimento, onde a estirpe Bac foi inoculada em meio LB líquido, esse meio foi então mantido em agitação por 24 h. As coletas foram realizadas nos intervalos de 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 12 h, ressaltando-se que entre as coletas a cultura continuou em agitação. Com as amostras coletadas nos intervalos de tempo determinados foi realizado outro ensaio well diffusion, com a B06 semeada na placa e as amostras dos sobrenadantes distribuídas nos poços da placa.

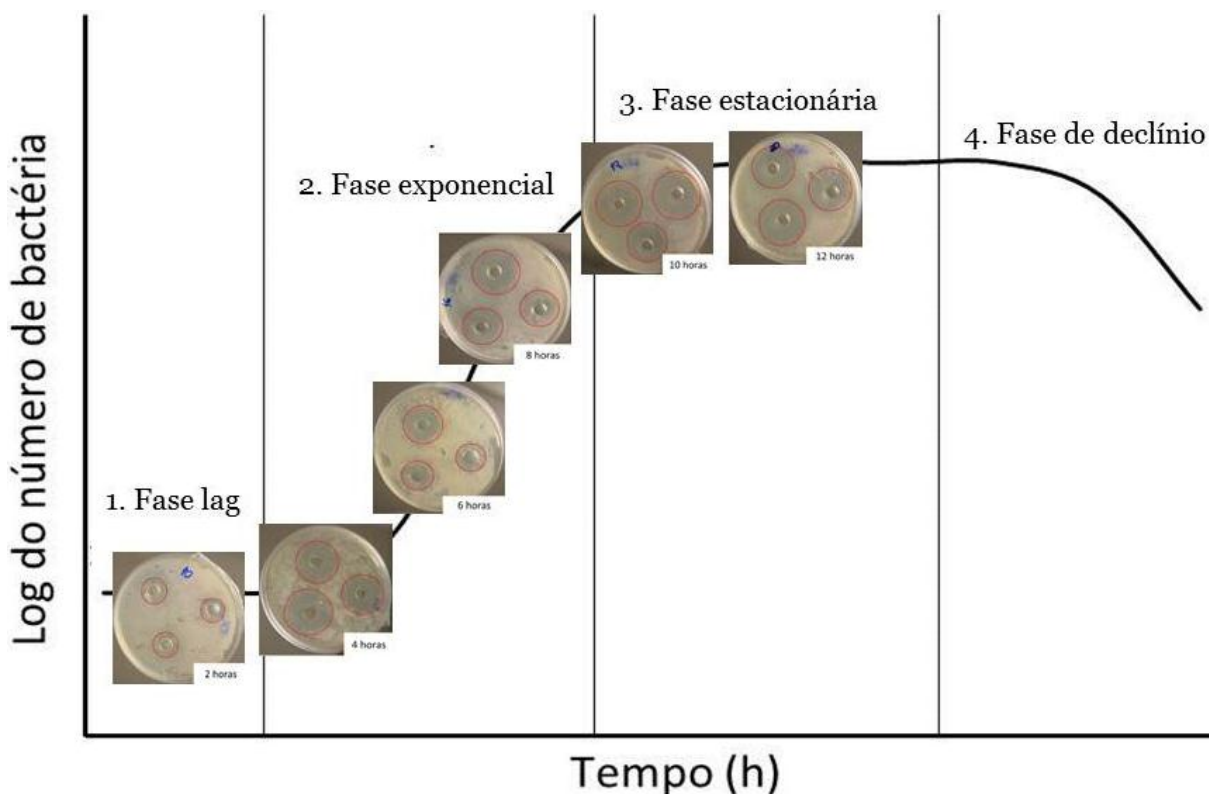
As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 72 horas. Os resultados indicaram que houve a formação de halo em todos os períodos da coleta e eles variaram de tamanho em cada coleta, como pode ser observado na figura 5. Cada tipo de bacteriocina é produzida em períodos diferentes da fase de crescimento bacteriano como pode ser observado na figura 6. Os resultados indicaram que a produção começou com 4 horas de crescimento e foi aumentando até o seu ápice entre 8 e 10 horas de crescimento, após esse período a produção começou a cair e o halo pode ser visto com um tamanho menor, como pode ser observado na tabela 3.

Figura 5: Ensaio de confronto do sobrenadante da Bac contra B06. Visualização dos halos após 24 horas da inoculação da placa.



Fonte: elaborado pela autora

Figura 6: Gráfico da cinética de crescimento bacteriano.



Fonte: elaborado pela autora

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

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

Fonte: elaborado pela autora

4. DISCUSSÃO

O *Bacillus thuringiensis* é um bacilo Gram negativo, aeróbio facultativo e produtor de esporo. Em sua morfologia bacilar o Bt apresenta cristais de proteínas durante a esporulação, que são responsáveis pela toxicidade do Bt.

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas secretadas por algumas bactérias e que tem potencial inibitório contra outros microrganismos, da mesma espécie ou diferente (VELHO, 2010; COTTER *et al.* 2005).

De acordo com Schulz e colaboradores (2003) as classificações das bacteriocinas de bactérias ácidoláticas investigadas até o momento diferem em seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. Klaenhammer (1993) propôs que, baseadas na sua estrutura primária, massa molecular, estabilidade à altas temperaturas e organização molecular as bacteriocinas de bactérias ácido-láticas podem ser subdivididas em quatro grupo. A classe I, conhecida também como lantibióticas é representada pela nisina, caracterizada por possuir pequenos peptídeos de 19 a 38 aminoácidos não usuais como lantionina, B-metilantionina.

Dridier *et al.*, (2006) afirmou que a classe I possui um mecanismo de ação duplo, que atuam na síntese da parede celular e na formação de poros na membrana celular, alterando a permeabilidade celular e levando a morte. A classe II possui peptídeos pequenos, menores que 10 kDa, estáveis à altas temperaturas e que não contem lantionina. Essa segunda classe apresenta uma estrutura que permite sua inserção nas membranas de seus alvos e consequente despolarização da membrana, causando morte celular. A classe III é representada por bacteriocinas maiores que 30 kDa e lábeis ao calor e que possuem um mecanismo de ação responsável pela lise da parede celular causado pela catálise da parede celular. A classe IV inclui bacteriocinas que formam complexos com carboidratos e lipídeos, essa classe não apresenta muitos estudos bioquímicos a seu respeito (COTTER *et al.*, 2005; KLAENHAMMER, 1993).

As bacteriocinas produzidas pelo Bt apresentam um espectro de ação variado e tem ação bacteriolítica e bacteriostática contra diferentes espécies de bactérias (CHERIF, et al., 2001). A primeira bacteriocina descrita foi a thuricina, ela é capaz de inibir mais de 40 estirpes de Bt e também algumas outras espécies de bactérias Gram positivas patogênicas. A thuricina não inibe bactérias Gram negativas. Quando submetida a diferentes condições de temperatura, ph e proteases a thuricina tem a capacidade de perder, reduzir ou manter sua atividade inibitória (YOUSTEN, 1984).

A tochicina foi a segunda bacteriocina produzida por Bt a ser caracterizada. Essa bacteriocina não apresentou potencial de inibição contra bactérias Gram negativas, mas foi capaz de inibir diferentes espécies de Bt. A tochicina pode ser encontrada no meio da fase log e atinge o seu maior pico no meio da fase estacionária. Ela possui efeito bactericida e bacteriostático. Quando tratada com enzimas como tripsina, não apresentou perda ou redução de sua atividade, já quando houve tratamento com proteinase K ela perdeu sua atividade. Em temperaturas acima de 100°C por mais de 30 min ela perde sua atividade (PAIK *et al.*, 1997).

A thuricina 7 pode ser encontrada no final da fase exponencial e tem seu pico no meio da fase estacionária. Ela é sensível a proteinase K e é estável em pH de 3 a 9. Em temperatura de 90°C apresenta atividade de 90%. Tem capacidade de inibir *Streptococcus pyogenes* e *Lysteria monocytogenes* (CHERIF *et al.*, 2001; RASI, 2010).

A entomocina 9 foi capaz de inibir 80 estirpes de *B. cereus*. Essa bacteriocina tem sua produção no meio da fase exponencial e atinge seu pico no começo da estacionária. Apresenta sensibilidade a proteinase K, isso indica que ela é proteica. É termoestável em temperaturas de 85 e 95°C e não apresenta perda de atividade quando colocada em tampão de pH entre 3 e 9 (CHERIF, *et al.*, 2003).

Os ensaios realizados nesse trabalho confirmaram que a estirpe Bac isolada apresenta um potencial de produção de bacteriocinas, porém a bacteriocina encontrada não foi capaz de inibir bactérias patogênicas. A capacidade de a bacteriocina inibir ou não outras espécies de bactérias podem ser visualizadas na cinética de crescimento, em que podem ser observadas as quatro fases do crescimento bacteriano, com a formação de um gráfico que mostra a quantidade de bactéria em função do tempo, ou seja, indica o momento de produção da bacteriocina.

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

Os resultados dessa pesquisa indicaram que a produção da bacteriocina da bac ocorreu na fase exponencial e começou a diminuir no meio da fase estacionária. Segundo Rasi (2010), a produção das bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* varia do final da fase log até o meio da fase estacionária. A queda da produção pode estar associada ao início da esporulação, pois esse processo é caracterizado pela queda de atividade do composto.

Observou-se que os halos eram visíveis e delimitados após 24 h da adição do sobrenadante onde cresceu a estirpe Bac. Dos demais tempos de observação, os halos desapareceram, indicando um efeito restrito da bacteriocina produzida pela estirpe Bac no crescimento da estirpe B06. Esse tipo de efeito é consistente com o efeito bacteriostático que é relatado para algumas bacteriocinas. Esse efeito é caracterizado por causar uma inibição no crescimento de outras bactérias, mas não as mata. Além desse efeito o *Bt* é

conhecido também por possuir ação bacteriolítica, ou seja, capacidade de matar outras bactérias e eliminá-las (MURRAY *et al.*, 2004).

As bacteriocinas produzidas por Bt são conhecidas por inibirem o crescimento de bactérias patogênicas e os produtos desenvolvidos com elas são utilizados há mais de 50 anos e trazem inúmeros benefícios para a saúde pública (MONNERAT, 2007; CÁRDENAS *et al.*, 2001).

Na indústria alimentícia as bacteriocinas têm sido utilizadas na obtenção de produtos de alta qualidade, seguros e sem a adição de conservantes químicos. O uso das bacteriocinas é aplicado também para a conservação dos alimentos contra alguns microrganismos patogênicos (SOUZA *et al.*, 2005;). A associação dos procedimentos utilizados na fabricação, embalagem e estocagem dos produtos é capaz de disponibilizar condições desfavoráveis à sobrevivência de microrganismos patogênicos (COTTER *et al.*, 2005; VELHO, 2010; DEEGAN *et al.*, 2006). A utilização das bacteriocinas na indústria alimentícia não apresenta risco tóxico como a maioria dos conservantes, uma vez que as bacteriocinas podem ser degradadas por enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal (GUINANE *et al.*, 2005).

5. CONCLUSÕES

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

Os resultados indicaram o grande potencial biotecnológico que *B. thuringiensis* apresenta, mostrando que suas bacteriocinas apresentam potencial de inibição contra algumas estirpes que foram isoladas. Portanto o isolamento de Bt é importante para a descoberta de novas estirpes que tenham um melhor potencial para o uso biotecnológico, que pode ser utilizado para inibir espécies patogênicas de bactérias e também no uso industrial.

6. REFERÊNCIAS

BOWDISH, D.M., DAVIDSON, D.J. Hancock RE. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. **Current Protein Peptide Science**. Saif Zone, v. 6, n. 1, p. 35-51, Feb. 2005.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; SLAMA, K.B.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 32, n. 4, p.243-247, Apr. 2001.

CHERIF, A.; CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Detection and characterization of the novel bacterion entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 95, n. 5, p. 990-1000, 2003.

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

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**. London, v. 3, n. 10, p. 777-788, Oct. 2005.

DEEGAN L.H.; COTTER, P.D.; HILL C.; ROSS P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. Barking, v. 16, n.9, p. 1058-1071, Sep. 2006.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, Jun. 2006.

DROBNIIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 6, n. 4, p. 324–338, Oct. 1993.

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

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v.89, n.6, p. 1316-1325, 2005.

HENG, N.C.; BURTENSHAW, G.A.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, n.23, p. 7763–7766, Dec. 2007.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Federation of European Microbiological reviews**. Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, Sep. 1993.

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

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

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

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

PAIK, H.D.; BAE, S.S.; PAN, J.G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**. Houndmills, v. 19, n. 4, p. 294-298, Oct. 1997.

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

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

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

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

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

SILVA, N. da. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae* L., 1763**. 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.). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p. 1105, 1986.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. ***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas inseticidas**. 2010. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

SOUZA E.L.; SILVA C.A.; SOUZA C.P. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 48, n. 4, p. 559-566, Jul. 2005.

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

VELHO, R.V. **Identificação de Genes de Bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens de *Bacillus* isolados da região amazônica**. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, setembro, 2010.

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