

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA LAÍS PAZDIORA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis* (Bt) NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2019

SABRINA LAÍS PAZDIORA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Bacillus thuringiensis (Bt) NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel, no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia

TOLEDO 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis* (Bt) NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Por

SABRINA LAÍS PAZDIORA

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia vinte e oito de novembro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel, no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o ***trabalho Aprovado***.

Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia (Orientador)

Prof. Dr. Cleverson Busso
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Prof. Dr. Patricia Dayane Carvalho Schaker
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

****A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da Especialização***

RESUMO

PAZDIORA, Sabrina Laís. Isolamento e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* (Bt) na região oeste do Paraná. 2019 Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2018.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), tem formato de bastonetes, é Gram-positiva e esporulante, podendo produzir um cristal anexo ao esporo com potencial toxicológico. Devido a este potencial é amplamente estudada para utilização como bioinseticida contra pragas agrícolas de ordem Lepidoptera, Coleóptera e Díptera, e pragas urbanas como o mosquito *Aedes aegypti*, até podendo ser utilizado seu DNA para desenvolver transgênicos. O que torna a busca por novos haplótipos constante. Nosso objetivo foi buscar novos isolados, realizando coletas de solo em áreas de cultivo convencional da região oeste do Paraná, em mata urbana e reserva legal. As amostras foram isoladas em meio nutritivo com ampicilina, as colônias caracterizadas morfológicamente, submeteu-se a extração do DNA, reação de PCR para os genes *16S*, *gyrB*, *cry1*, 2, 3, 4, 10, 11. Para quantificação e confirmação de todos os resultados foi realizado eletroforese em gel de agarose, seguido por purificação com polietilenoglicol e enviado das amostras para sequenciamento por empresa terceirizada, quando o tamanho de banda encontrado foi o esperado. As sequências editadas foram comparadas com sequências do Gene Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para identificação molecular. Os resultados do *16S* e o *gyrB* confirmaram que 16 amostras podem ser *Bacillus thuringiensis* e é possível que algumas amostras apresentem o gene *cry4*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*; proteína cry; métodos moleculares.

ABSTRACT

PAZDIORA, Sabrina Laís. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in western Paraná. 2019 Course Completion Project - Bioprocess Engineering and Biotechnology. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2018.

The bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt), gram-positive and sporulant wand shaped, which can produce an attached crystal to the spore with toxicological potential. Due to this potential and extensively studied for use as a bioinsecticide against agricultural praires of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera, and urban praires such as the *Aedes aegypti* gnat, this DNA can be used to develop transgenics. What makes the search for new haplotypes constant. Our goal was to search for new isolates, performing soil collections in areas of conventional cultivation, urban forest and legal reserve in western Paraná. Samples were isolated in ampicillin nutrient medium, colonies morphologically characterized, DNA extraction, PCR reaction for 16S, *gyrB*, *cry1*, 2, 3, 4, 10, 11 genes. For quantification and confirmation of all results were performed electrophoresis in agarose gel, followed by purification with polyethylene glycol and sent to sequencing by a third-party, when the band size is found like expected. The sequences were edited and compared to the GenBank sequence (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) for molecular identification. The 16S and *gyrB* results confirm that 16 isolates may be *Bacillus thuringiensis* and it is possible that they may have the *cry4* gene.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; cry protein; molecular methods

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

µL- Microlitros

Bt - *Bacillus thuringiensis*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

mg – Miligrama

mg/L- Miligrama por litro

min – Minuto

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

Pb- pares de bases

PCR – Reação em cadeia de polimerase

RNA – ácido ribonucléico

TBE – Tris/Borato/EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura do complexo esporo-cristal: (A) cb: cristal bipiramidal, cc: cristal cuboide; (B) cb: cristal bipiramidal, ep: esporo; (C) cr: cristal redondo, ep: esporo.

Figura 2: Mecanismo de ação da toxina de Bt.

Figura 3: Representação das regiões da toxina cry. Em azul domínio I, em amarelo domínio II e em vermelho domínio III.

Figura 4: Locais de coleta das amostras.

Figura 5: Isolado de bactéria a partir de amostras de solo.

Figura 6: Coloração Gram realizadas nos diferentes isolados.

Figura 7: Eletroforese de uma extração de DNA.

Figura 8: Eletroforese da amplificação do gene 16S.

Figura 9: Eletroforese da amplificação do gene *gyrB*, ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

Figura 10: Eletroforese da amplificação do gene *cry1*. Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

Figura 11: Eletroforese da amplificação do gene *cry2*. Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

Figura 12: Eletroforese da amplificação do gene *cry3*. Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

Figura 13: Eletroforese da amplificação do gene *cry4*. Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

Figura 14: Eletroforese da amplificação do gene *cry10*. Ordem de aplicação no gel
imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A,
imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

Figura 15: Eletroforese da amplificação do gene *cry11*. Ordem de aplicação no gel
imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A,
imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	9
1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS E METAS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Locais e método de coleta	15
4.2 Isolamento e cultivo	16
4.3 Análises morfológicas	16
4.3.1 Características da colônia.....	16
4.4 Análise de Microscopia Óptica	16
4.4.1 Procedimento de coloração Gram.....	16
4.5 Extração de DNA.....	17
4.6 Quantificação do DNA.....	17
4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	18
4.8 Purificação	19
4.9 Eletroforese.....	20
4.10 Sequenciamento	20
4.11 Análise de Bioinformática.....	21
4.12 Materiais e Reagentes.....	21
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	24
5.1 Isolamento e análises morfológicas	24
5.2 Análise de microscopia óptica.....	25
5.3 Caracterização molecular.....	25
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
APÊNDICE I	40

1 INTRODUÇÃO

Em um contexto histórico, somente depois da segunda guerra mundial a agricultura passou a ter uma dependência de fertilizantes e pesticidas sintético e de mecanização agrícola, devido ao aumento da demanda de alimentos no mundo. Antes deste período a produção era diversificada e com integrações com a pecuária. A busca por maximização produtiva traz juntamente consequências ecológicas e altos custos sociais, na sua maioria devido ao aumento incontável do uso de fertilizantes e pesticidas químicos (ROEL, 2002).

O uso intensivo de defensivos agrícolas resultou em um desequilíbrio biológico, contudo a proteção de plantas se faz necessária para o escalonamento de produção. Com a preocupação da sociedade em produtos sem contaminantes, estudos são realizados buscando a utilização de controles biológicos, podendo estes serem eficientes tanto quanto agrotóxicos, sem causar danos ao ambiente e a sociedade (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Os bioinseticidas utilizados para substituir pesticidas químicos são em sua maioria produzidos com linhagens de *Bacillus thuringiensis* (Bt), e a comercialização destes produtos é efetiva no âmbito de produtos orgânicos. Bettiol & Morandi (2009), ainda destaca que os bioprodutos passam por um alto custo para legalização, o que limita o desenvolvimento dos mesmos, gerando assim uma comercialização de produtos ineficientes.

O Bt é uma bactéria encontrada principalmente no solo, tem formato de bastonetes, é Gram-positiva, esporulante e com capacidade de produzir proteínas em forma de cristais, os quais possuem atividade tóxica para a forma larval de insetos (POLANCZYK & ALVES, 2003). O autor descreve que a variação entre *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus* é simplesmente a presença ou ausência dos cristais, pois a Bt tem capacidade de codificar a endo-toxina e o *B. cereus* não possui esta capacidade.

Para diferenciar linhagens de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* a região conhecida por 16S, descrita como altamente conservada durante a evolução genética, foi amplamente utilizada, porém alguns estudos demonstram que para este grupo de micro-organismos não é possível diferenciá-los com a utilização deste gene. (CHEN & TSEN, 2001; YAMADA, 1999). Com isso Yamada (1999), empregou um gene da

girase conhecido como *gyrB* o qual codifica a proteína da subunidade B da DNA girase, sendo está altamente específica para este grupo de micro-organismos.

O cristal tóxico apresenta amplo espectro de ação contra diferentes ordens de insetos como Lepidóptera, Dípteras e Coleóptera. Estudos já demonstram a capacidade tóxica contra pragas urbanas como o *Aedes aegypti*, conforme retratado por (BUKHARI & SHAKOORI, 2010).

As análises moleculares são utilizadas para identificação correta das espécies de *Bacillus* e para comprovar a presença do cristal tóxico, avaliando seu formato, tamanho e a sequência gênica que o codifica, o que por sua vez caracteriza os diferentes genes *cry* já descritos (ZHENG *et al.*, 2013).

Neste contexto, o desenvolvimento do presente projeto de pesquisa busca encontrar novos isolados de Bt através da coleta, isolamento e caracterização molecular de bactérias de solos de cultivo em culturas agrícolas no oeste paranaense.

2 OBJETIVOS E METAS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar novos isolados de *Bacillus thuringiensis* de solos com cultivo agrícola do oeste paranaense, pela morfologia e marcadores moleculares específicos dos genes *16S*, *gyrB* e *cry*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter isolados da bactéria a partir de amostras de solo de áreas agrícolas do Oeste do Paraná;
- Realizar análises morfológicas, diferenciando o grupo *Bacillus*;
- Amplificar o gene *16S*, gene *gyrB* e o gene *cry* dos isolados;
- Sequenciar as amostras amplificadas;
- Comparar as sequências do gene *16S* e do gene *gyrB* com sequências encontradas em banco de dados para identificação molecular dos isolados;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Após a Segunda Guerra Mundial, uma revolução conhecida como “Revolução Verde” trouxe uma modernização para a agricultura. Este processo ocorreu devido a utilização de máquinas, insumos e técnicas produtivas levando a uma dependência de fertilizantes e pesticidas sintéticos, como o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) e seus análogos as quais aumentam a produção e outros agentes que melhora as condições da terra para o cultivo. Isto acarretou em um aumento na oferta de alimentos per capita no mundo (NUNES, 2007; ROEL, 2002).

Conforme Roel (2002), em 1962 com a publicação de Raquel Carson o livro *Primavera Silenciosa*, o mundo passou a ver os agrotóxicos como danoso ao ambiente e aos animais em geral e desta forma tomavam conta do real problema que eram os agentes tóxicos. Relata-se ainda por Nunes (2007), que após a conferência Mundial das Nações Unidas sobre Meio Ambiente, a ECO-92, a luta do homem em defesa da vida iniciou-se fortemente, pois a poluição industrial e agrícolas se elevavam, assim como o uso de pesticidas, com isso à qualidade do ar e dos alimentos diminuía, devido a problemas fitossanitários resultantes do desequilíbrio ecológico.

Com isso uma alternativa que pode ser utilizada é a agricultura ecológica ou orgânica, porém esta alternativa é mais penosa quanto ao trabalho, e a produtividade adquirida é menor, pois é um modelo que bane o uso de qualquer agente químico sintético (NUNES, 2007; ROEL, 2002). Outra alternativa menos custosa e com resposta mais rápida para melhor eficiência, é a utilização de transgenia, a qual faz manipulação do material genético buscando características como resistência a pragas e doenças (VALOIS, 2001; MOMMA, 2003).

Buscando a diminuição do uso de agrotóxicos emprega-se o controle biológico, tendo esta metodologia duas formas de ser empregada como controle biológico natural e introdução exógena de um agente de controle biológico. O controle biológico é a utilização de parasitóides, predadores no controle de insetos, sendo que a utilização destes bioinseticida não causam efeito toxico no ambiente e em animais. No Brasil existem alguns produtos que já estão disponíveis e podem ser utilizados como o fungo *Hansfordia pulvinata*, para o mal-da-folha de seringueiras; a bactéria *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças entre outros (BETTIOL & MORANDI, 2009; VALICENTE & TUELHER, 2009).

Segundo Bettiol & Morandi (2009), o conhecimento sobre os microrganismos utilizados como agente de controle biológico e doenças de plantas, são datados a mais de 5.000 anos. No início do século XX, a descoberta do *Bacillus thuringiensis* (Bt) levou a um grande avanço na utilização dos mesmos para um controle microbiano ou bioinseticida.

A bactéria Bt é o agente de controle biológico com maior eficácia de proteínas inseticidas, o que tem maior diversidade destas proteínas, sendo eficaz em um amplo espectro de pragas, tem-se uma facilidade para produção em massa, tem alta adaptabilidade da formulação convencional e tecnologia de aplicação, além de poder ser utilizado em conjunto a técnicas biomoleculares para criar plantas transgênicas com resistência aos insetos (HOEVELER, 2016; CONSTANSKI, 2015).

O *B. thuringiensis* foi descrita pela primeira vez em 1911 por Berliner é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, apresenta células com formato de bastonetes e produz uma importante proteína denominado *cry* ou endo-toxina. As toxinas *cry* são proteínas com ação entomopatogênica para as ordens Lepidoptera, Coleóptera, Díptera, Hymenoptera, Homóptera e Mallophaga, ainda podendo atuar contra alguns tipos de nematoides (BRAVO *et al.*, 2012; MORE *et al.*, 2011; RICIETO *et al.*, 2011; POLANCZYK & ALVES, 2004).

As bactérias *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* são morfologicamente semelhantes, mas diferenciam nos efeitos patológicos. Fazer a diferenciação entre as três espécies morfologicamente ou bioquimicamente é muito complicada, alguns autores relatam dificuldades para realizar esta diferenciação até mesmo com metodologias moleculares devido a alta homologia entre as espécies, tendo outros autores que consideram todas da mesma espécie, variando em subespécies (OLIWA-STASIAK *et al.*, 2009; MORE *et al.*, 2011; HELGASON *et al.*, 2000; KO *et al.*, 2003).

Buscando inferir relações filogenéticas entre as bactérias, o gene 16S rDNA, conhecido como gene 16S, vem sendo largamente utilizado pois contém regiões conservadas e variáveis e está presente em todos os organismos, além de seu tamanho ser relativamente pequeno permitindo seu sequenciamento rápido (COENYE & VAADAMME, 2003; IBIAL *et al.*, 2019).

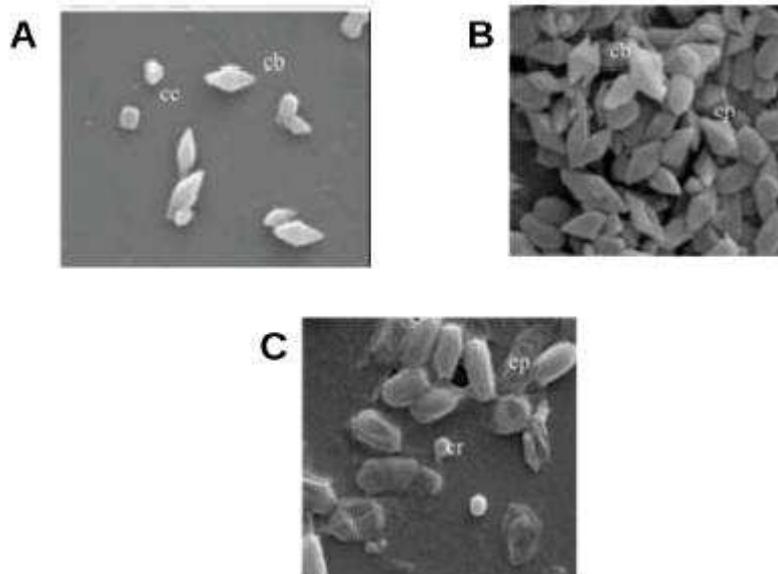
Polanczyk & Alves (2003), sugerem que a comparação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* quanto a métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídios e comparação da sequência de 16S, comprovam que as duas espécies são na verdade somente uma. A diferença entre as

mesmas é devido a presença ou não de plasmídeos que codificam as endotoxinas presentes em *B. thuringienses*.

Buscando formas de diferenciar as espécies sugere-se a utilização do gene *gyrB*, o qual codifica a proteína da subunidade B da DNA girasse. Esta região é responsável pela regulação do enrolamento do DNA de fita dupla e está presente universalmente entre espécies bacterianas. A diferença encontrada entre as espécies estudadas encontra-se no padrão de digestão apresentada (AWAD *et al.*, 2007).

Segundo Bravo *et al.* (2012), mais de 700 genes *cry* já haviam sido sequenciados, e após o sequenciamento foram classificadas em grupo de acordo com o aminoácido produzido. No presente momento tem-se mais de 70 grupos distintos de proteínas *cry* diferentes, as quais apresentam formato diferenciado, tamanhos diferentes e grau de toxicidade variados (AMMOONS *et al.*, 2013). O formato do cristal varia de acordo com a composição de protoxina, podendo variar em bipiramidal (*cry1*), cuboidal (*cry2*), retangular plano (*cry3A*), irregular (*cry3B*), esférico (*cry4A* e *cry4B*) e romboidal (*cry11A*), alguns exemplos podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura do complexo esporo-cristal: (A) cb: cristal bipiramidal, cc: cristal cubóide; (B) cb: cristal bipiramidal, ep: esporo; (C) cr: cristal redondo, ep: esporo.

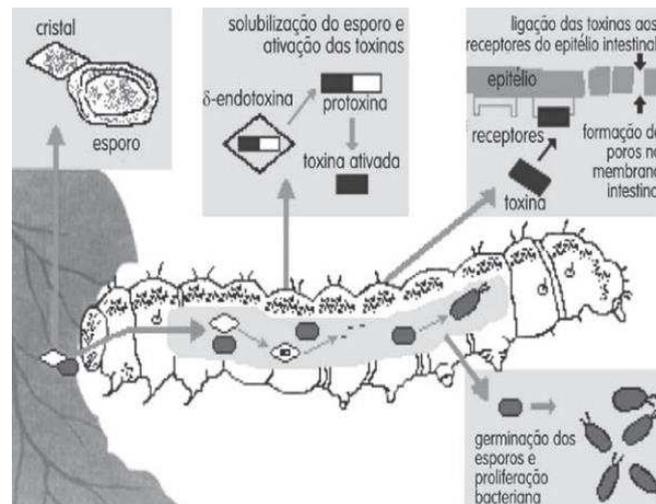


Fonte: ABREU, 2006.

O mecanismo de ação da toxina é determinado pela ligação entre as toxinas *cry* e a microvilosidade da superfície das células do intestino médio da fase larval do

inseto. Antes da ingestão da proteína pela larva, as protoxina não estão ativas, para se ativarem necessitam ser ingeridas e solubilizadas e processadas por proteases no intestino, o processo pode ser visualizado na Figura 2 (NASCIMENTO, 2017; BRAVO *et al.*, 2012; POLANCZYK & ALVES, 2004).

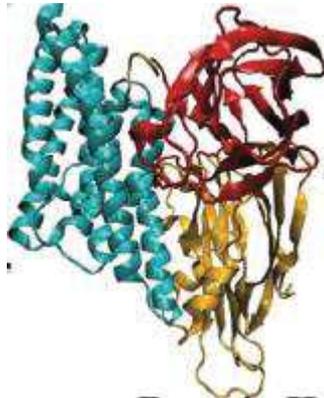
Figura 2: Mecanismo de ação da toxina de Bt.



Fonte: PINTO & FIUZA, 2008.

Análises realizadas demonstram a presença de três domínios diferentes nos cristais de algumas cepas de Bt. O domínio denominado 1 é responsável pela oligomerização da toxina, inserção de membrana e formação de poros. O domínio II é envolvido na ligação a proteínas do intestino médio larval específicas, já o domínio III é responsável pelo reconhecimento dos receptores, como pode ser visualizado na Figura 3. Os domínios II e III são ditos como responsáveis pela especificidade da toxina (BRAVO *et al.*, 2012; NASCIMENTO, 2017).

Figura 3: Representação das regiões da toxina *cry*. Em azul domínio I, em amarelo domínio II e em vermelho domínio III.



Fonte: BRAVOS *et al.*, 2012.

Todos os processos de organismos vivos são controlados pelo DNA. O DNA foi descoberto por Friedrich Meischer, passando pela publicação de James Watson e Francis Crick de 1953 que descreveram o DNA sendo uma dupla hélice, formado de nucleotídeos. A necessidade de saber como funcionavam os processos biológicos nos organismos, buscou-se determinar como é a ação do DNA. Nesse sentido, decifrar todo o código genético de um organismo, denominado genoma, se tornou o foco de inúmeros cientistas, e em 1970 dois grupos de pesquisadores, um liderado por Frederick Sanger e outro por Gilbert desenvolveram diferentes estratégias de sequenciamento do DNA (SANTOS *et al.*, 2013; SNUSTAD & SIMMONS, 2010).

Para sequenciar o DNA é necessária uma etapa de amplificação do mesmo, utilizando protocolos de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Este procedimento foi desenvolvido por Kary Banks Mullis em 1983, e desde sua implantação a Biologia Molecular tem crescido em muitos aspectos. A PCR é um método sensível e específico, e com uma pequena quantidade de DNA é possível amplificar gerando um alto número de sequências, o que permite sequenciar por metodologia de Sanger (BARATO & MEGIOLARO, 2012; ZAHA *et al.*, 2012).

O que limita a realização da PCR é a necessidade de utilizar iniciadores (*primers*), os quais devem ser desenhados, e para isto é necessário a utilização de complementares, podendo gerar resultados insertos (OLIWA-STASIAK *et al.*, 2009). Segundo Zaha *et al.* (2012), o procedimento acontece através de desnaturação, anelamento de *primers* e extensão do DNA, o processo ocorre em termociclador com

rápido aquecimento e resfriamento, causando a desnaturação anelamento e polimerização.

Segundo Santos *et al.* (2013) o sequenciamento busca saber por um conjunto de complexos processos químicos, a ordem em que as bases nitrogenadas, Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) e Guanina (G), estas sequências são responsáveis por expressar a característica tóxica do Bt. O método de Sanger é um dos mais utilizados e consiste em incorporar o último nucleotídeo na extremidade de alongamento da cadeia estando este marcado com fluorescência, o que permite a detecção do mesmo. Este processo é realizado utilizando uma cadeia simples de DNA.

A utilização da PCR e sequenciamento no estudo do Bt vem ajudando a desvendar aspectos da taxonomia desse grupo de bactérias e a descoberta de haplótipos diferentes na sequência do DNA dos genes *cry*, o qual propicia a produção de diferentes cristais, com formato e toxicidade diferentes (SACCHI *et al.*, 2002; NOGUERA & IBARRA, 2010).

Descobrir novos isolados utilizando técnicas moleculares como citadas anteriormente são as práticas mais utilizadas, pois com amostras de solo pela técnica de extração de DNA e de PCR é possível amplificar regiões específicas do DNA que já foi demonstrado sua toxicidade para diversos insetos praga diferentes, tais como *Spodoptera eridania* e *Spodoptera frugiperda*. Algumas vezes os resultados encontrados não apresentam o gene *cry*, porém a presença do mesmo não pode ser descartada, pois as análises são realizadas normalmente utilizando-se *primers* específicos e a toxina pode ser expressa de variadas formas, podendo então o isolado apresentar outro gene *cry* cuja sequência não permite o pareamento com o *primer* utilizado, sendo necessário a utilização ou desenvolvimento de um novo *primer* característico (PINTO & FIUZA, 2003; CONSTANSKI *et al.*, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

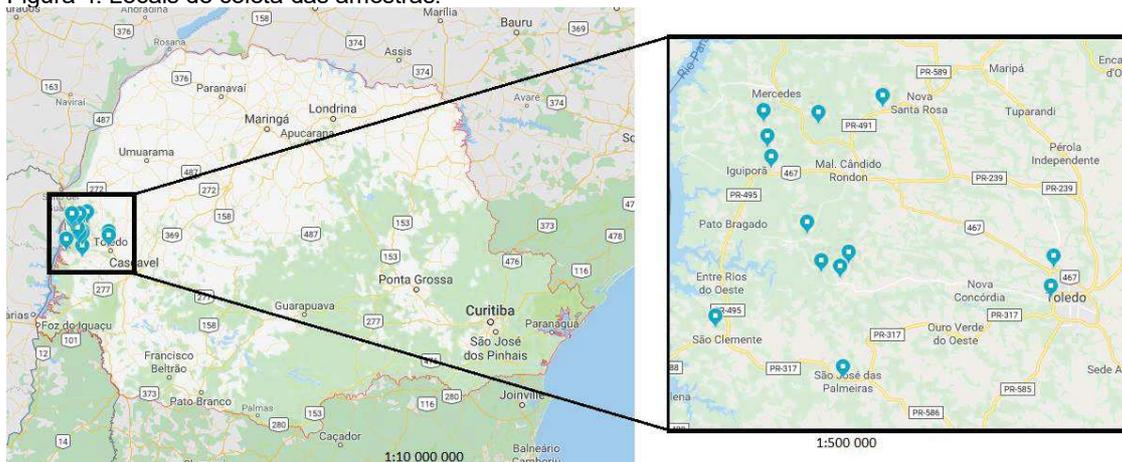
4.1 Locais e método de coleta

As amostras de solos foram coletadas em diferentes locais do oeste do estado do Paraná, com a ajuda da empresa Copagrill, sendo amostras de cultivo agrícola, de reserva legal e de floresta urbana, os locais de coleta podem ser visualizados na Figura 4.

Um termo de consentimento prévio informado foi redigido, no qual o proprietário da terra autoriza a utilização da amostra para estudos descritos (APENDICE I). No documento consta dados do estudo a ser realizado, os dados do possuinte, assinatura do mesmo autorizando a utilização das amostras para o estudo e local da coleta.

Para a coleta foi necessário um recipiente, sendo este um saco plástico com aba adesiva e identificação, e uma espátula. A coleta foi realizada entre 5-10 cm de profundidade, com o solo seco, em 3 pontos diferentes na área total de coleta. A amostra foi armazenada em local com refrigeração, posteriormente enviada para o laboratório de Biologia molecular da UTFPR Toledo para prosseguir com as análises.

Figura 4: Locais de coleta das amostras.



Fonte: Google Earth-Maps, 2019

4.2 Isolamento e cultivo

O procedimento foi realizado nos laboratórios de Microbiologia e Biologia molecular da UTFPR Campus Toledo. O cultivo inicial em meio sólido, para conseguir colônias que fossem resistentes a ampicilina e posteriormente fez-se o estriamento em meio sólido para obter colônias isoladas, o meio utilizado foi Ágar Nutritivo, onde para 1 L são utilizados: 1 g de extrato de carne, 2 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio, 15 g de ágar e ampicilina 5 mg.

Para conseguir o isolamento das colônias, as amostras de solo foram diluídas em água destilada na proporção de 1 g de solo para 10 mL de água destilada. Após a diluição um processo de choque térmico foi utilizado para eliminar espécies mesofílicas, sendo este realizado em banho maria à 80 °C por 12 minutos seguido de 5 minutos em gelo e posterior crescimento por 48 h em BOD a 35 °C. Pois os esporos de Bt são resistentes ao choque térmico.

4.3 Análises morfológicas

4.3.1 Características da colônia

Após o cultivo em BOD as bactérias formaram colônias, sendo selecionada as que apresentarem tamanho médio de aproximadamente 0,5 cm, cores esbranquiçadas, opacas e bordas irregulares.

4.4 Análise de Microscopia Óptica

4.4.1 Procedimento de coloração Gram

A coloração Gram foi realizada com corantes biológicos para atribuir cor a parede celular conforme sua estrutura. O procedimento é amplamente difundido e

para ser realizado são necessários soluções de cristal violeta, água destilada, lugol, álcool-acetona ou álcool absoluto, fucsina de Gram, lâmina para fazer o esfregaço de células e microscópio para analisar. Inicialmente um esfregaço de células na lâmina foi feita, posteriormente cobriu-se a mesma com a solução de cristal violeta por 1 minuto, lavou-se com água destilada, adicionou-se solução de lugol por 1 minuto, lavar novamente, gotejou-se o álcool-acetona ou álcool absoluto por 15 segundos, em seguida lavar com água corrente, cobrir o esfregaço com fucsina de Gram por 30 segundos, lavar com água destilada e deixar secar. Analisou-se em microscópio a coloração e formato da bactéria, para Bt a coloração é violeta característico de Gram-positivo e formato de bastonetes, como é possível verificar em resultados na Figura 6.

4.5 Extração de DNA

As colônias isoladas foram cultivadas em microtubos de 1,5 ml com caldo nutritivo em mesa agitadora com controle de temperatura, à 35 °C com 200 rpm de agitação durante 24 horas para produção de células suficientes para realizar a extração de DNA. Os microtubos foram submetidos a centrifugação à 13.000 rpm por 3 minutos formando uma massa de células utilizada para extração do DNA que foi realizada de duas maneiras, utilizando-se o kit *wizard* de extração de DNA genômico da Promega® seguindo recomendações do fabricante, com adaptações, e realizando o método da fervura, o qual extrai material genômico e plasmidial, consiste em ferver as amostras por 15 minutos seguida de banho de gelo por 10 minutos, após estas etapas realiza-se uma centrifugação por 5 minutos à 14.000 rpm, coleta-se o sobrenadante, metodologia adaptada (BARATTO & MEGIOLARO, 2012).

4.6 Quantificação do DNA

Para quantificar o DNA foi necessário fazer uma eletroforese (descrita posteriormente), utilizando uma alíquota de DNA *Ladder* 100bp, sendo assim possível a comparação das bandas formadas pelo DNA extraído com bandas do *Ladder* que possuem quantidade de DNA conhecida.

4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR teve um volume final de 30 µl e realizada em termociclador. As quantidades dos reagentes utilizados na PCR foram as recomendadas pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase e está representada a seguir: 3 µl de tampão 10X, 1 µl de solução de dNTP (10 mM cada base), 0,5 µl de Mg²⁺ (25 mM), 1 µl de cada um dos dois *primers* (10mM), 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5U/ µl), 3 µl de DNA (10ng/ µl) e H₂O ultrapura para completar o volume final. As condições de reação foram definidas no termociclador de acordo com o gene a ser amplificado. Basicamente as condições seguiram as seguintes etapas: um passo inicial à 95 °C por 2 minutos para ocorrer a desnaturação total do DNA, seguido de 35 ciclos, desnaturação (95 °C por 40 segundos), anelamento (50-58°C por 40 segundos) e extensão (72 °C por 1 minuto), além de um passo final de extensão de 10 minutos a 72 °C, após os 35 ciclos.

Durante a pesquisa, após a amplificação do gene *16S* percebeu-se que este gene não confirma sobre o isolado ser *B. thuringiensis*, com isso buscou-se novas metodologias que fosse possível para esta confirmação. O gene *gyrB* demonstrou-se em muitos trabalhos altamente eficiente para este fim, logo realizamos a reação para o mesmo.

Para obter um resultado satisfatório na identificação a nível específico dos isolados foi necessário realizar análises com do gene *gyrB* utilizando um *primer* espécie específica para Bt, pois em conjunto com dados encontrado para *16S* obtém-se resultados melhores (CHEN & TSEN, 2002).

A partir da confirmação sobre os isolados realizou-se a reação em cadeia da polimerase para os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry10* e *cry11* os quais são responsáveis por codificarem a proteína com potencial entomopatogênico.

Foram amplificados por PCR os genes *16S*, *gyrB*, *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry10* e *cry11*. Os primers, temperatura de anelamento e o tamanho do produto de anelamento estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: *Primes* utilizados na reação de cadeia da polimerase (PCR).

Gene amplificado	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Temperatura de anelamento (°C)	Produto (pb)
<i>16 S</i>	5' AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG 3'	5' CGGTTACCTT GTTACGACTT 3'	51	1377
<i>cry 1</i>	5' TGAGTCGCTTC GCATATTTGACT 3'	5' CTGGATTTACA GGTGGGGATAT 3'	52	558
<i>cry 2</i>	5'GAGTTTAATCGAC AAGTAGATAATTT 3'	5'GGAAAAGAGAATA TAAAATGGCCAG 3'	50	526
<i>cry 3</i>	5' CGTTATCGCAG AGATGACATTAC 3'	5' CATCTGTTGTTT CTGGAGGCAAT 3'	52	652-733
<i>cry 4</i>	5' TCAAAGATCATT TCAAATTACATG 3'	5' CGGCTTGATCTA TGTCATAATCTGT 3'	51	439
<i>cry 10</i>	5' TCAATGCTC CATCCAATG 3'	5' CTTGTATAGG CCTTCCTCCG 3'	52	348
<i>cry 11</i>	5' CGCTTACAG GATGGATAGG 3'	5' GCTGAAACGGC AGAATATAAATA 3'	51	342-352
<i>GyrB</i>	5' ATCGGTGATA CAGATAAGACT 3'	5' CCTTCATACGTA TGAATATTATTT 3'	58	368

Fonte: (IBARRA *et al.*, 2003; RICIETO, 2013; YAMADA, 1999; BRAVO, 1998).

4.8 Purificação

Após realizada a amplificação algumas amostras foram purificadas e mandadas para análise de sequência. O procedimento foi executado com polietilenoglicol (PEG), onde adicionou-se em microtubos a quantidade de 1:1 de PEG e produto de PCR, homogeneizou-se, e posteriormente os tubos são colocados em banho-maria com temperatura de 37 °C por 15 minutos. Na sequência realizou-se uma centrifugação para sedimentar os resíduos, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, e foram adicionados 125 µL de etanol 80% gelado, em seguida o produto foi novamente centrifugado por 5 min a 13.000 rpm para sedimentar o produto da PCR. Então o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com pipeta e o processo com etanol foi repetido por 2-3 vezes, por fim buscando retirar o máximo de etanol possível, o sobrenadante foi removido. Deixou-se secar em temperatura até não

restarem vestígios de etanol no tubo. O DNA foi ressuspendido em água milliQ em volume proporcional a concentração inicial do DNA.

4.9 Eletroforese

Para a quantificação do DNA extraído, a confirmação da amplificação do gene por PCR e o produto do PCR purificado foi realizado o método de eletroforese com gel de agarose. A preparação do gel é feita com tampão de trisborato-EDTA (TBE) com 1% de agarose. O TBE primeiramente foi feito concentrado 10x e posteriormente diluído, para fazer o TBE foram necessário 106 g de Tris, 55 g de ácido bórico e 9,55 g de EDTA, solubilizado em 1 L de água destilada e autoclavado. O gel foi corado com *Sybr Safe*, que é um corante de DNA não tóxico e que pode ser utilizado na visualização do DNA sob luz LED azul.

A eletroforese ocorreu em cuba de eletroforese onde o gel é mergulhado em TBE 1x para condução da corrente elétrica. Os parâmetros elétricos utilizados foram voltagem de 80 V, corrente de 100 mA e 20 W. A corrida teve duração de aproximadamente 60 minutos. Após a eletroforese o registro fotográfico do gel foi feito em transiluminador de luz LED azul.

4.10 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado por empresa terceirizada, a qual utiliza-se do método de Sanger que consiste em a partir de uma cadeia simples incorporar nucleotídeos com fluorescência. Assim podendo diferencia-los. Foram enviados para a empresa uma quantidade do DNA, para as amostras que apresentaram resultado positivo do *16S*, *gyrB* e para o *cry*, amplificado e purificado entre 30 e 60 ng, juntamente com 5 pmoles do *primer Forward*, completando-se o volume para 6 μ L. Para o envio, as amostras foram desidratadas em estufa de secagem a 60°C e posteriormente enviadas pelo correio para a empresa.

4.11 Análise de Bioinformática

As sequências de DNA obtidas no sequenciamento foram analisadas através do alinhamento local de sequências de DNA utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do banco de dados de sequências de DNA do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>>) para encontrar sequências similares. Um alinhamento múltiplo de sequências, foi realizado, através da ferramenta *Clustal Omega* disponível no site do EBI (*European Bioinformatics Institute*) utilizando-se as sequências obtidas no presente estudo com as selecionadas no BLAST para correção de bases sequenciadas incorretamente através da análise no programa *BioEdit* dos eletroferogramas disponibilizados no serviço de sequenciamento. Após a edição, as sequências foram analisadas novamente no BLAST para a identificação molecular das espécies isoladas.

O programa MEGA 7.0 foi utilizado para as sequências do gene *16S* para realizar análises de distância genética, de diversidade genética e construção do dendrograma *Neighbor Joining* com 10.000 reamostragens de *Bootstrap*.

4.12 Materiais e Reagentes

Lista de materiais necessário para realização do projeto:

- Vidrarias;
- Micropipetas de diferentes volumes;
- Ponteiras para micropipetas de diferentes volumes;
- Microtubos de diferentes volumes;
- Placas de Petri;

- Tubos de ensaio;
- Extratos para meio de cultivo;
- Cloreto de sódio;
- Ágar;
- Ampicilina
- Água ultrapura
- Kit de extração de DNA
- Reagentes para eletroforese em gel de agarose
- Reagentes para PCR
- Polietilenoglicol
- Etanol
- Isopropanol

Lista de Equipamentos necessários para realização do projeto:

- Fluxo laminar
- Incubadora de bancada com agitação orbital com controle de temperatura
- B.O.D.
- Centrífuga
- Banho maria
- Cuba para eletroforese horizontal

- Transiluminador
- Termociclador
- Estufa para secagem
- Autoclave

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e análises morfológicas

Foram coletadas um total de dezessete amostras de solo, sendo 4 de floresta urbana, 2 de reserva legal, e onze amostras de solo agrícola. Após a coleta, realizou-se a submissão das amostras a um procedimento de choque térmico, resultando no crescimento em placas com ampicilina para as amostras de mata urbana e agrícola, indicando resistência a ampicilina característica apresentada pela Bt, para o solo de reserva legal não houve nenhum crescimento.

Considerando que cada colônia seja um isolado de Bt, selecionou-se colônias que foram isoladas para posteriores análises, totalizando 16 isolados, sendo 6 para mata urbana (01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M) e 10 para solo agrícola (09A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A), além de contar com duas amostras de DNA do município de Dois Vizinhos, coletadas em bosque de eucalipto (07DV, 08DV). Na Figura 5 é possível verificar um isolado, foto ilustrativa de todas as amostras.

Após verificar o isolamento foi analisada a morfologia apresentada de cada colônia, as quais apresentaram cores esbranquiçadas, opacas e bordas irregulares característico do grupo *B. cereus* possível verificar na Figura 5.

Figura 5: Isolado de bactéria a partir de amostras de solo.

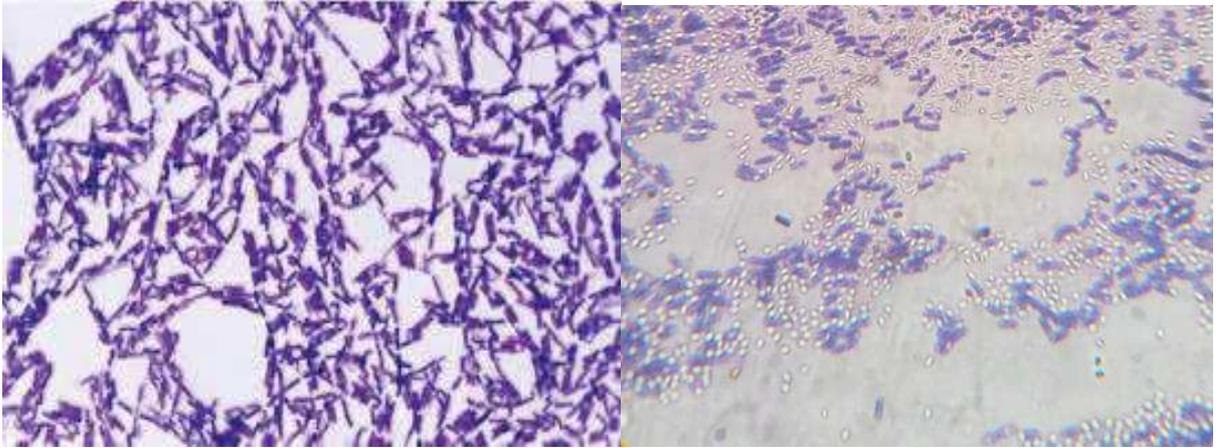


Fonte: Autor, 2019.

5.2 Análise de microscopia óptica

Uma alíquota de cada isolado selecionado foi friccionada sobre uma lâmina, as análises de coloração Gram demonstraram que todas as amostras selecionadas apresentavam característica gram-positiva, formato de bastonetes e formação de esporos como é possível verificar na Figura 6.

Figura 6: Coloração Gram realizadas nos diferentes isolados.

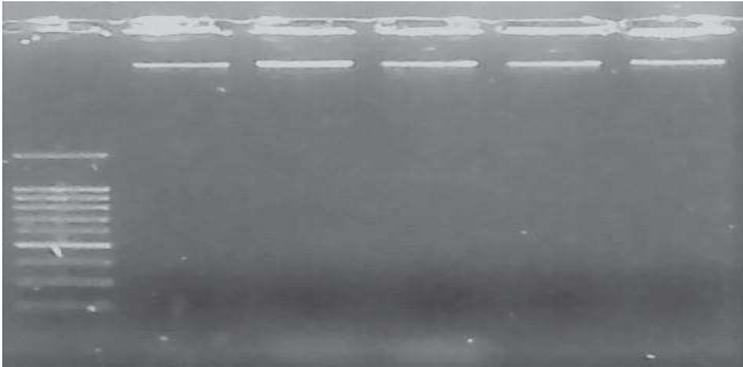


Fonte: Autor, 2019.

5.3 Caracterização molecular

Inicialmente fez-se a extração de DNA genômico de todos os isolados, seguidos de eletroforese buscando verificar a qualidade e quantidade de DNA extraído o qual apresenta grande quantidade. Como pode ser visualizado na Figura 7, esta não contempla todos os DNAs extraídos, foto demonstrativa.

Figura 7: Eletroforese de uma extração de DNA.

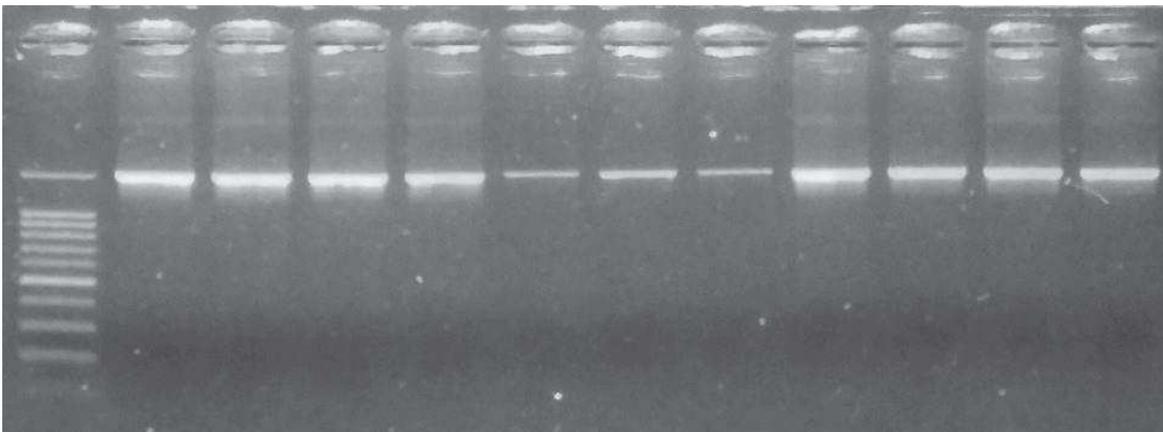


Fonte: Autor, 2019.

O procedimento de extração foi realizado utilizando o kit de extração de DNA genômico o qual foi eficiente para realizar a PCR para dos genes *16S* e *gyrB*, e para os genes *cry* o DNA genômico não se mostrava eficiente, necessitando assim um procedimento que extrai-se também o DNA plasmidial, onde a maioria dos genes que codificam para os *cry* estão presentes, desta forma o método utilizado foi de extração para o método de fervura.

As análises moleculares inicialmente foram realizadas para o gene *16S*, o qual obteve-se resultado positivo para todas as amostras, apresentando um tamanho esperado de 1377pb, Figura 8, a figura não abrange todas as amostras.

Figura 8: Eletroforese da amplificação do gene *16S*.



Fonte: Autor, 2019.

Após o alinhamento e edição das 16 amostras, obteve-se sequências de 777 pares de bases. Essas sequências foram utilizadas na análise de BLAST e o resultado

dessa análise indicou alto grau de identificação (acima de 98%) com espécies tais como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereu*, *Bacillus thuriengiensis*, dentro outras. Portanto, os resultados do sequenciamento do gene 16S permitiram confirmar que as amostras pertencem ao gênero *Bacillus*, entretanto não foram conclusivos para determinar qual espécie.

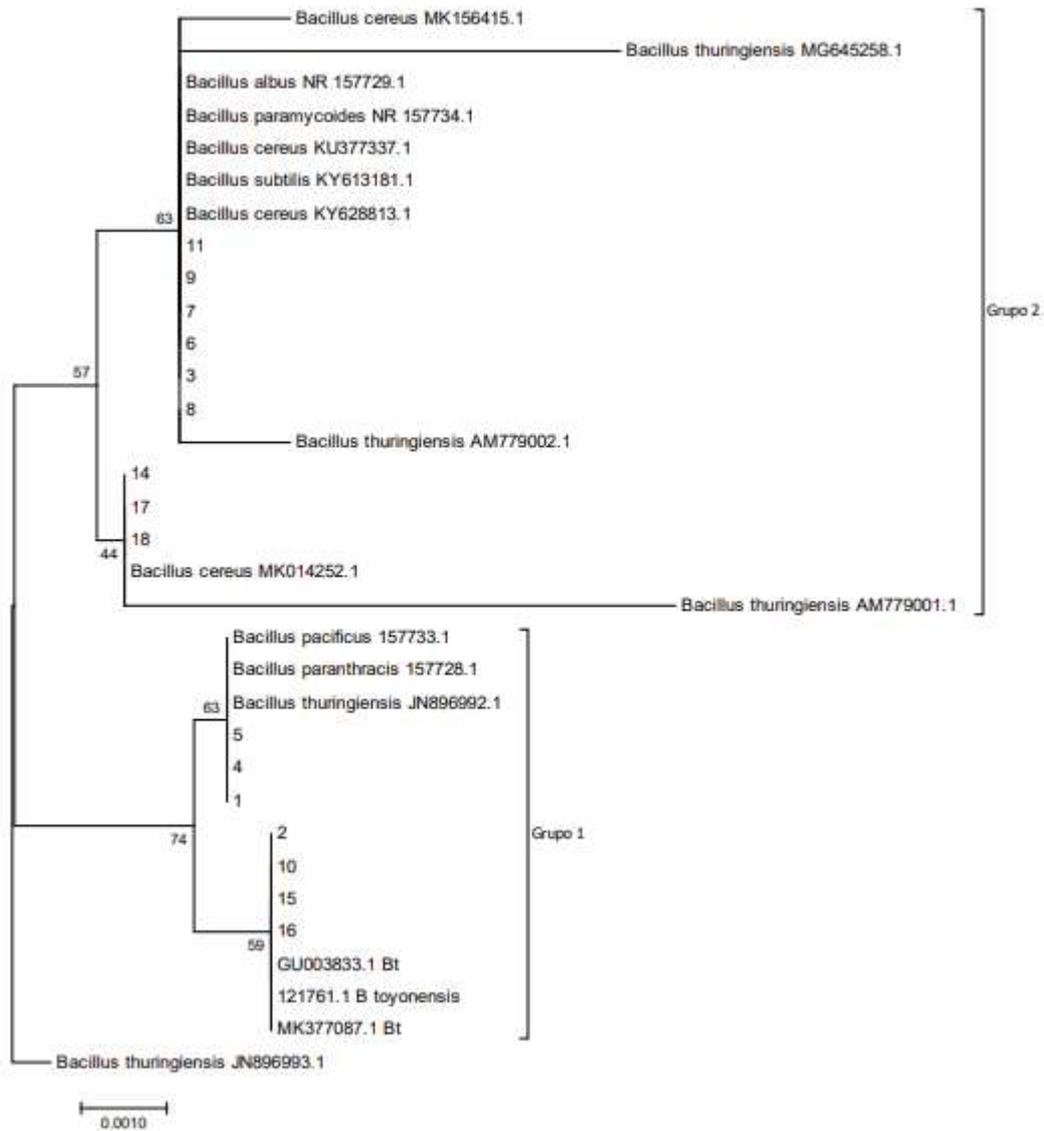
Na análise de diversidade genética, dentre os 777 pb analisados, foram observados quatro SNPs, sendo que três permitiram separar as amostras em dois grupos. Os indivíduos 01M, 02M, 04M, 05M, 10A, 15A e 16A formaram um grupo, denominado de grupo 1 e os indivíduos 03M, 06M, 07DV, 08DV, 09A, 11A, 14A, 17A e 18A formaram o grupo 2.

Os valores de distância genética "p" aos pares variou de 0 a 0,5%. As análises dos grupos demonstraram que o índice de diversidade genética dentro dos dois grupos foi de 0,01 e 0,02 entre os dois grupos. O coeficiente de diferenciação foi de 0,745. Esses resultados demonstram a formação de dois grupos, mas com baixa diferenciação genética entre eles.

Além das sequências do 16S das amostras obtidas no presente estudo, foram selecionadas mais 16 sequências de espécies de *Bacillus* que apresentaram alta identidade com as amostras estudadas para a construção da árvore filogenética pelo método *Neighbor-Joining* com 10.000 reamostragens de *Bootstrap*.

O resultado da árvore também identificou a formação de dois grupos com as amostras analisadas nesse estudo. Dentro dos dois grupos foi possível encontrar diferentes espécies de *Bacillus*, sendo que para os dois grupos houve a presença de amostras de *Bacillus thuringiensis*. Dessa forma não foi possível confirmar nem descartar as amostras de nenhum dos dois grupos como sendo da espécie *Bacillus thuringiensis*.

Figura 9: Árvore filogenética para *Bacillus thuringiensis* analisando o gene 16S.



Fonte: Autor, 2019.

A alta similaridade na sequência do 16S entre espécies de *Bacillus* já foi identificada por outros autores, que relatam a impossibilidade na identificação de espécies de *Bacillus* apenas com o sequenciamento do gene 16S. Chen & Tsen (2001), analisaram indivíduos selecionados aleatoriamente entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* para teste com 16S. Eles encontraram resultado positivo para *B. cereus* sendo que o indivíduo era de *B. thuringiensis*, mesmo ao utilizar *primers* de 16S modificados como sugerido em seu trabalho.

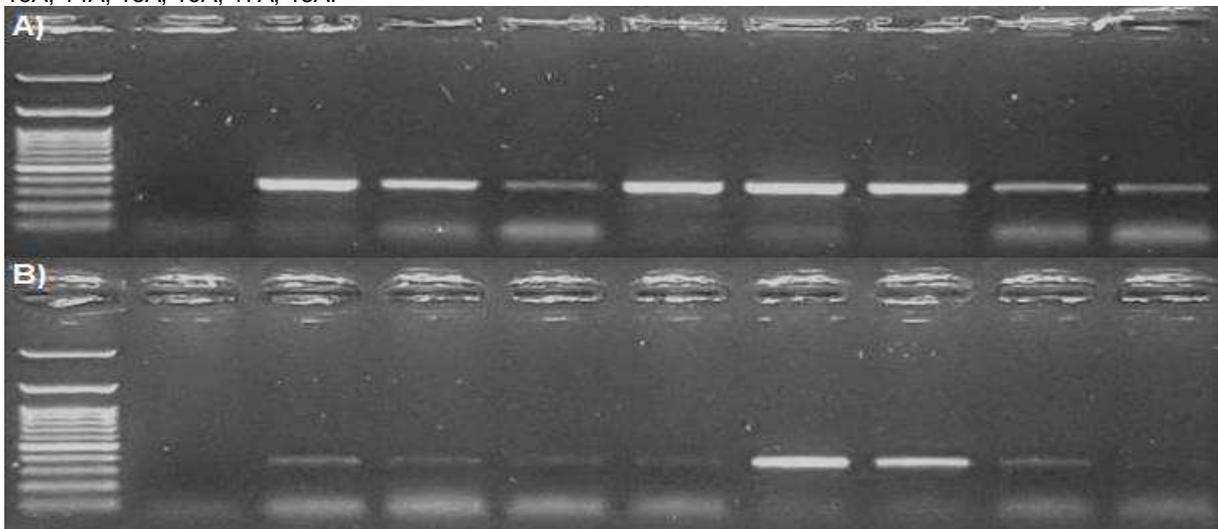
Quando compara-se *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* percebe-se que a variação encontrada na região do 16S é <1%, o que pode considerar estes microorganismos sendo da mesma espécie, pois pequenas variações não podem ser consideradas para diferenciação (SACCHI *et al.*, 2002).

Buscando outras formas de identificar molecularmente isolados de *B. thuringiensis*, pesquisadores começaram a utilizar do gene *gyrB*, o qual apresenta uma variação de bases mais considerável quando comparados com 16S (YAMADA *et al.*, 1999).

Yamada *et al.* (1999) desenvolveram um conjunto de *primers* que permite a identificação de amostras das espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*, onde *primers* espécie específicos só amplificam o DNA se utilizado o *primer* correspondente à espécie correta. Para o presente estudo foi sintetizado o *primer* específico para *Bacillus thuringiensis* e foi realizado a PCR para os 16 isolados.

O resultado dessa PCR apresentou resultado positivo para as 16 amostras, sendo que para as amostras 01M, 02M, 04M, 05M, 06M, 15A, 16A apresentou intensidade de banda forte, para as amostras 03M, 09A, 10A, apresentou intensidade de banda média, e as demais amostras apresentaram intensidade baixa. Todas com um tamanho esperado de 368pb, como é possível verificar na Figura 9.

Figura 9: Eletroforese da amplificação do gene *gyrB*, Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A.



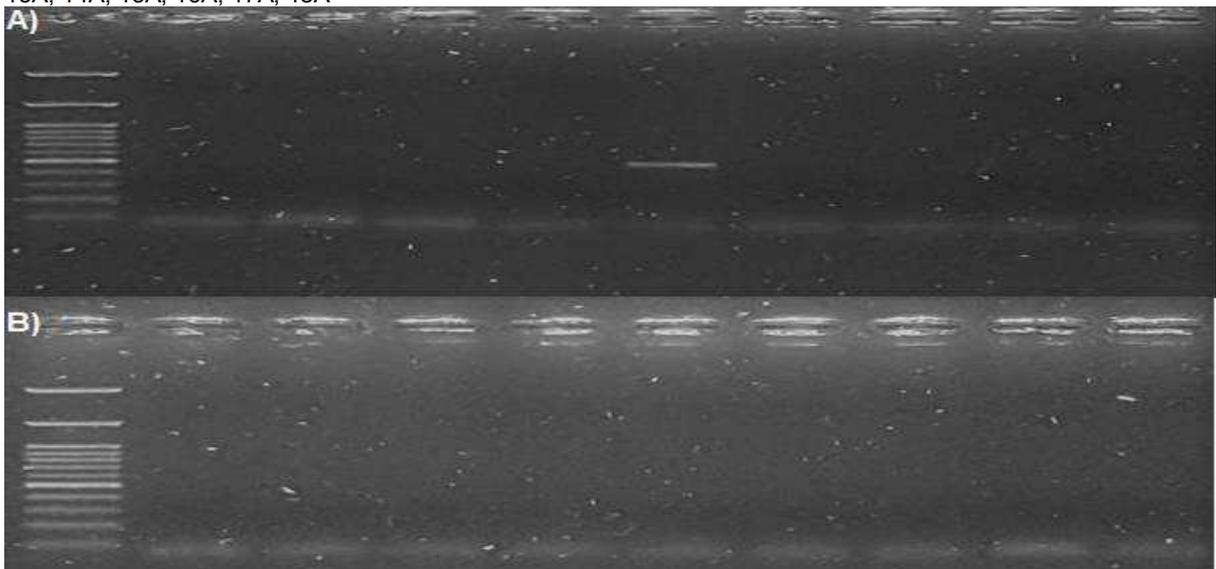
Fonte: Autor, 2019.

A utilização dessa metodologia permite distinguir as espécies do subgrupo *B. cereus*. Desta forma isolados que apresentam amplificação para o *gyrB* específico para Bt podem ser considerados Bt (YAMADA *et al.*, 1999). Para confirmar se o produto gênico obtido era realmente do gene *gyrB*, as amostras 01M, 04M, 05M, 06M, 09A, 12A e 15A foram selecionadas e encaminhadas para sequenciamento. O resultado foi comparado com amostras do GenBank através da análise do BLAST, e apresentaram alta identidade com sequências do gene *gyrB* de *B. thuringiensis*, confirmando que o produto gênico obtido é realmente do gene *gyrB*.

Podemos inferir que os isolados obtidos neste trabalho são da espécie *Bacillus thuringiensis*, porém a análise sequencial do produto amplificado se faz necessária para confirmação desse resultado. Baseando-se na hipótese de todas as amostras apresentarem características de Bt, todas foram analisadas para os genes *cry*.

Para o *cry1* houve amplificação de uma banda entre 450-500 pb para a amostra 04M, porém foi considerada como inespecífica pois o tamanho esperado é de 558 pb (IBARRA *et al.*, 2003; RICIETO, 2013; BRAVO, 1998) Figura 10. Essa amostra foi purificada e sequenciada e o resultado não apresentou similaridade com o gene em questão.

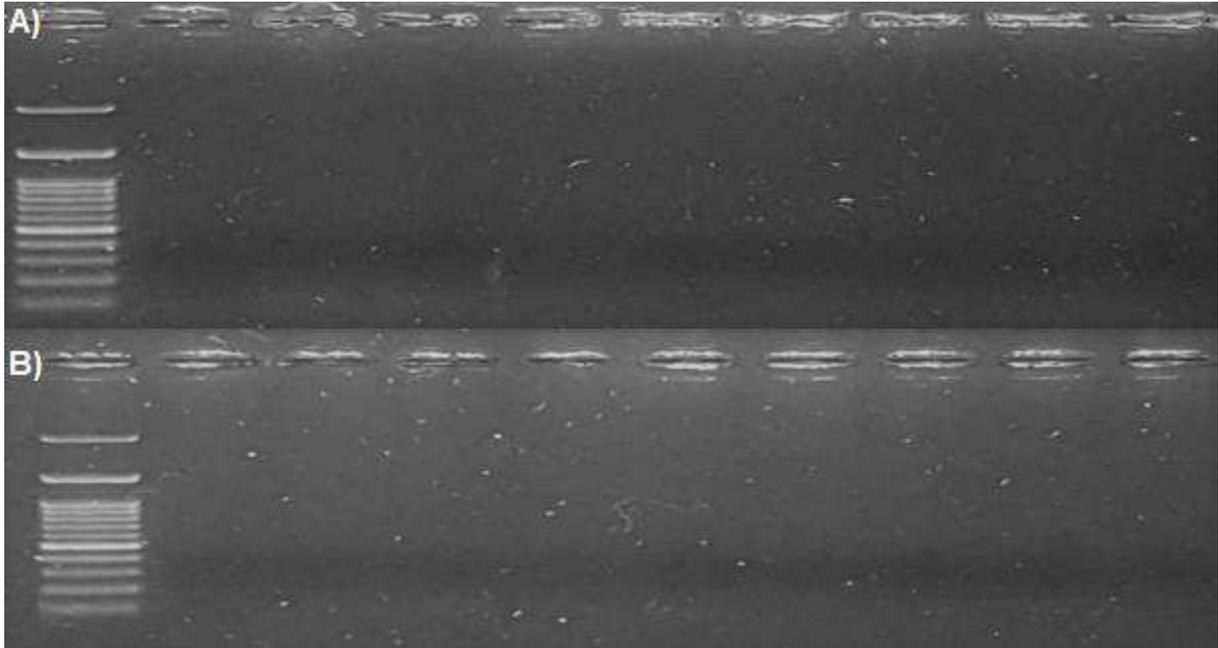
Figura 10: Eletroforese da amplificação do gene *cry1*, Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A



Fonte: Autor, 2019.

Para o *cry2* não foi amplificado nenhuma amostra, como é possível verificar na Figura 11.

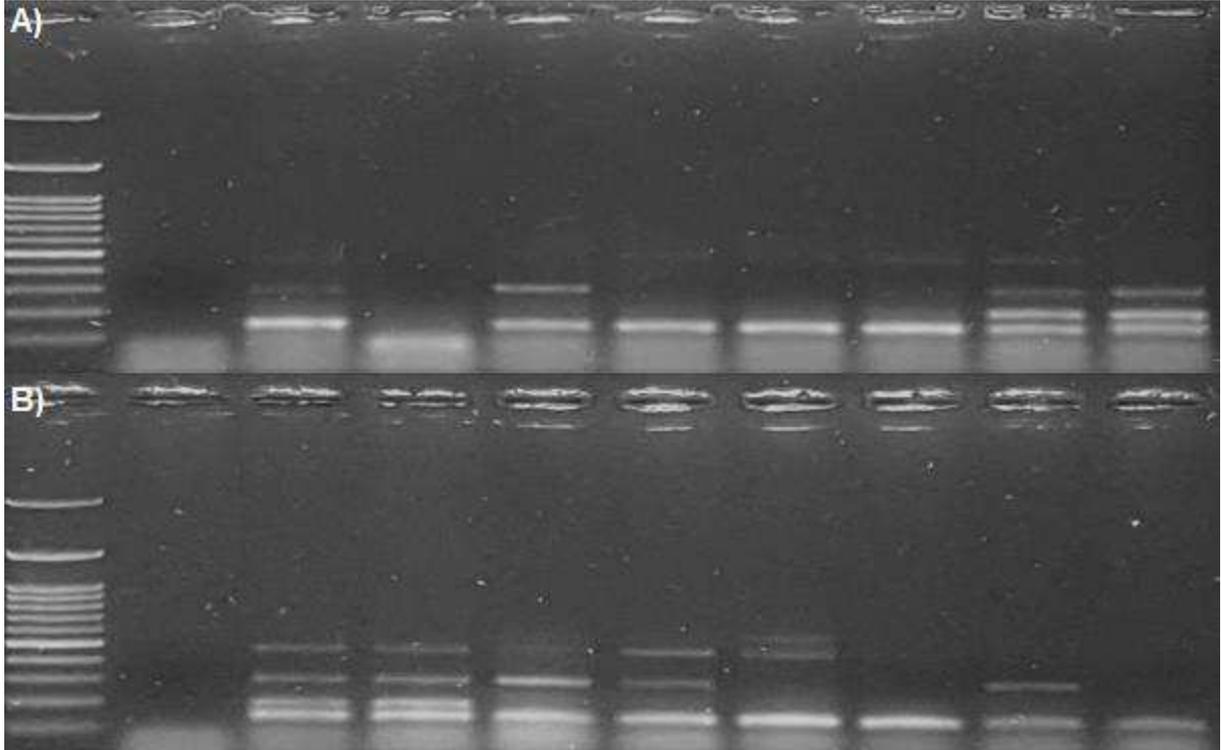
Figura 11: Eletroforese da amplificação do gene *cry2*. Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A



Fonte: Autor, 2019.

Pra o *cry3* houve amplificação de várias bandas, porém o tamanho de banda esperado é entre 652-733pb e todas as bandas produzidas foram inferiores a 500 pb (IBARRA *et al.*, 2003; RICIETO, 2013; BRAVO, 1998), com isto a bandas encontradas foram todas consideradas inespecíficas, Figura 12.

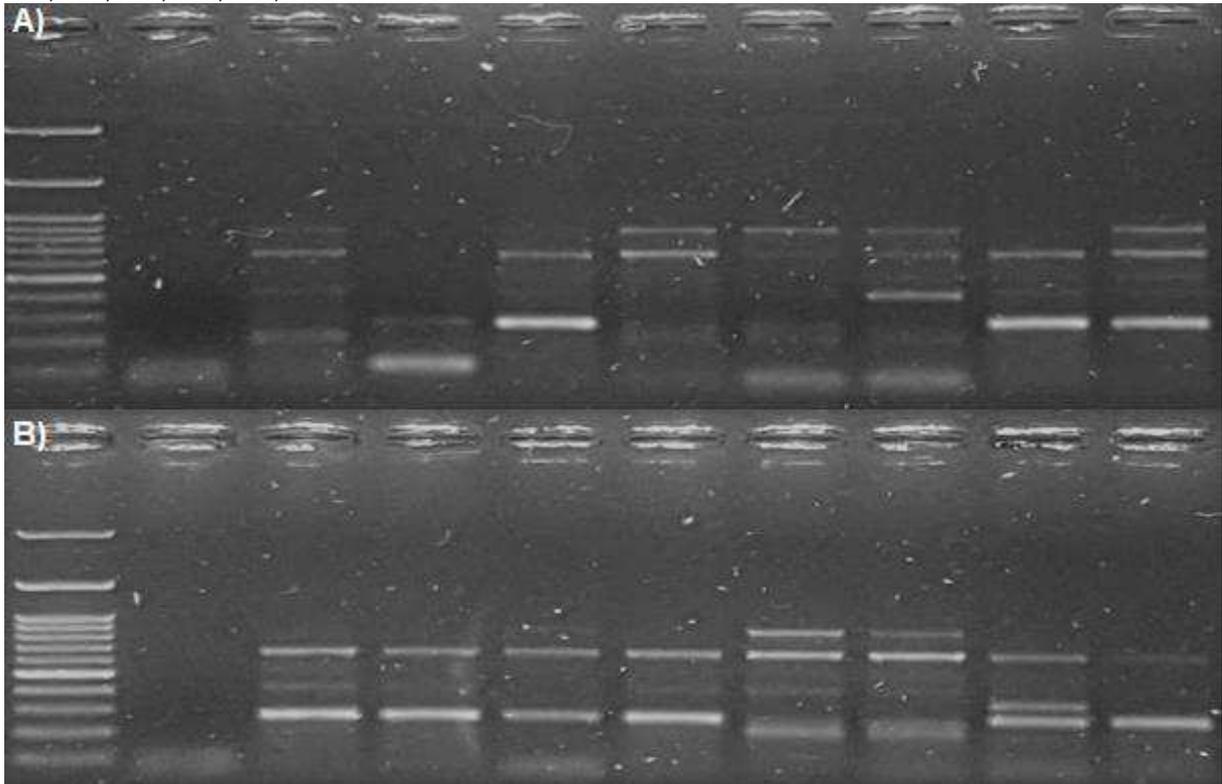
Figura 12: Eletroforese da amplificação do gene *cry3*, Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A.



Fonte: Autor, 2019.

Para o gene *cry4* houve a amplificação do fragmento de tamanho esperado de 439 pb (IBARRA *et al.*, 2003; RICIETO, 2013; BRAVO, 1998) para amostras 01M, 06M, 09A, 11A, 14A e 15A, entretanto uma grande quantidade de bandas inespecíficas também foi verificada (Figura 13). Para a confirmação da presença do gene *cry4* é necessário fazer a extração do DNA direto do gel de agarose a partir da banda de 439 pb para posterior purificação e sequenciamento, porém não foi possível realizar esse procedimento no presente trabalho.

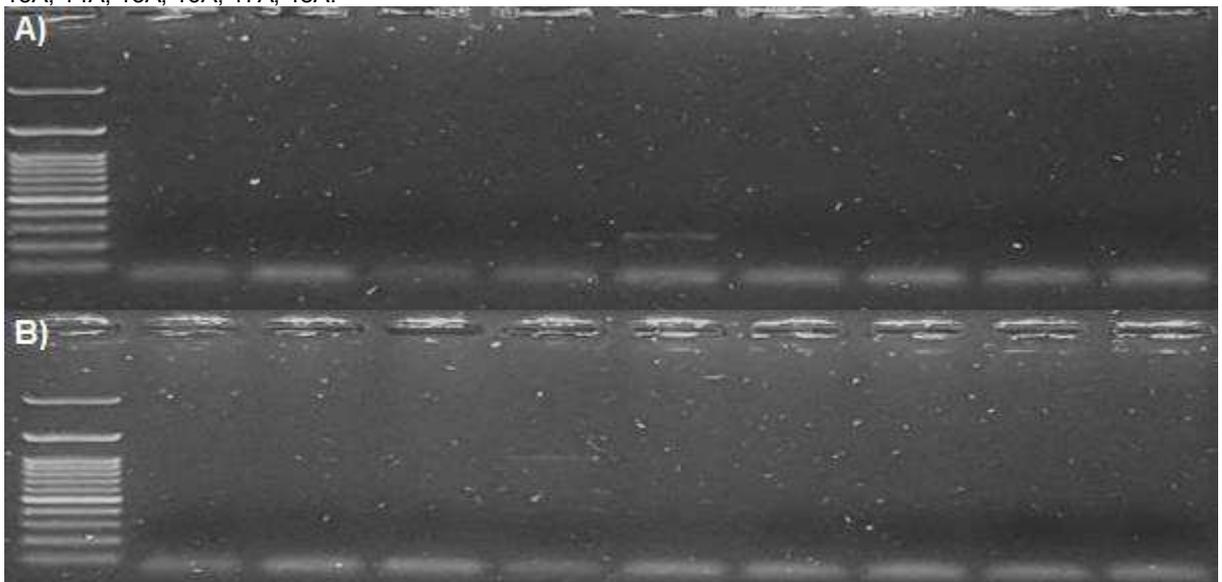
Figura 13: Eletroforese da amplificação do gene *cry4*, Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A.



Fonte: Autor, 2019.

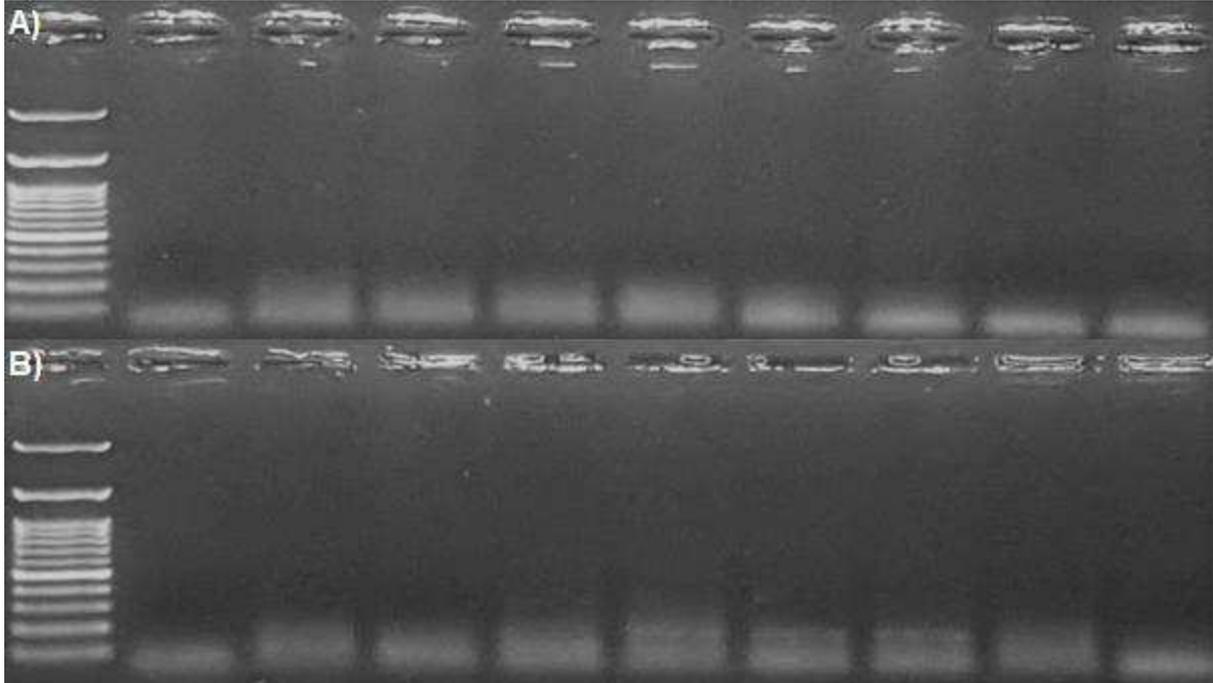
Os resultados se mostraram negativo para as amostras quando analisadas para o *cry10* e para o *cry11*, Figura 14 e Figura 15, respectivamente.

Figura 14: Eletroforese da amplificação do gene *cry10*, Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A.



Fonte: Autor, 2019.

Figura 15: Eletroforese da amplificação do gene *cry11*, Ordem de aplicação no gel imagem A: *Ladder*, branco da amplificação, 01M, 02M, 03M, 04M, 05M, 06M, 09A, 10A, imagem B: *Ladder*, branco da amplificação, 11A, 12A, 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A.



Fonte: Autor, 2019.

Os genes *cry* são classificados de acordo com a estrutura molecular, assim como quanto ao alcance de hospedeiro. Estes genes codificam proteínas com ação letal para variadas ordens de insetos, na sua forma larval (PINTO & FIUZA, 2008). Os genes analisados no presente estudo apresentam ação tóxica para as ordens Díptera, Coleóptera e Lepidóptera (IBARRA, 2003).

Segundo Ricieto *et al.* (2013) fatores como a vegetação onde amostras são coletadas não influenciam a presença ou ausência de Bt, isso pode ser verificado quando analisado os dois grupos distintos na análise do gene *16S*, pois dentro de cada grupo encontram-se amostras isoladas de solos de mata e de agricultura. De acordo com Silva *et al.* (2015) o clima é um fator relevante, o qual deve ser considerado, entretanto as amostras analisadas são da mesma região apresentando pouca variação no clima.

A variabilidade encontrada no gene que codifica a proteína com ação entomopatogênica é expressiva, com isto indivíduos podem apresentar mais de um gene, tendo assim ação em diferentes ordens de insetos. Desta forma as amostras

estudadas que não apresentaram amplificação devem ser analisadas novamente para outros genes *cry* (IBARRA, 2003).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo buscou analisar e identificar isolados de *Bacillus thuringiensis* de amostras coletada de diferentes locais. Para isso utilizou-se uma metodologia de microbiologia e biologia molecular, eficiente quando se refere a Bt.

Os resultados obtidos foram positivos para a caracterização molecular baseando-se no gene *16S* associado a análise do gene *gyrB*, porém o gene *16S* sozinho não apresentou uma confirmação sobre a espécie estudada somente para o gênero, necessitando assim a utilização do gene *gyrB*, o qual confirmou a espécie isolada.

Para os genes *cry* o resultado demonstrou que há possibilidades de amplificação para o gene *cry4* o qual possui ação entomopatológica mais eficiente para a ordem de insetos Coleóptera. Porém, não se descarta a possibilidade destes isolados apresentarem genes *cry* não avaliados neste estudo.

Desta forma são necessários novos estudos para confirma a presença dos genes *cry* para os isolados estudados, e para o gene *cry4* é necessário realizar o sequenciamento das amostras amplificadas, caso confirmado a presença do gene estudos quando a sua toxicidade deve ser realizada, podendo assim ser utilizado como um produto biotecnológico, exemplo um bioinseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I. L. d. **Identificação e caracterização de um gene *cry* recombinante de *Bacillus thuringiensis* var. *Londrina***. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006.
- AMMONS, David R. *et al.* A Novel *Bacillus thuringiensis* *cry*-Like Protein from a Rare Filamentous Strain Promotes Crystal Localization within the Exosporium. **Applied and Environmental Microbiology** p. 5774–5776 ,Vol. 79 N. 18, setembro 2013.
- Awad, MK, Saadaoui, I., Rouis, S. *et al.* Differentiation Between *Bacillus thuringiensis* Strains by *gyrB* PCR-Sau3AI Fingerprinting *Mol Biotechnol* (2007) 35: 171. <https://doi.org/10.1007/BF02686112>
- BARATTO, César Milton; MEGIOLARO, Fernanda. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 1, p. 121-130, jan./jun. 2012
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A. B. **Biocontrole de doença e pragas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, São Paulo, 2009.
- BRAVO, Alejandra *et al.* Evolution of *Bacillus thuringiensis* *cry* toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, 2012.
- BRAVO, A.; SARABIA, S. .; LOPEZ, L. *et. al.* Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 64, 1998.
- BUKHARI, DilAra Abbas; SHAKOORI, Abdul Rauf. Isolation and Molecular Characterization of *cry4* Harboring *Bacillus thuringiensis* Isolates from Pakistan and Mosquitocidal Activity of their Spores and Total Proteins. **Pakistan J. Zool.**, vol. 42(1), pag. 1-15, 2010.
- CHEN, M. L.; TSEN, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR *primers* and sequencing of their annealing sites. **Journal of Applied Microbiology** 2002, 92, 912–919
- COENYE, T.,. VANDAMME, P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. **FEMS Microbiol.** 2003.
- CONSTANSKI, Kelly Christiane, *et al.* Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, vol.50, n.8, pag.730-733, ago. 2015.
- GOOGLE EARTH-MAPAS. <https://www.google.com.br/maps/preview>. Consulta realizada em 18 de julho de 2019.

HELGASON, Erlendur *et al.* *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*— One Species on the Basis of Genetic Evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, jun. 2000.

HOVELER, Mônica. **PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA À BASE DE *Bacillus thuringiensis israelensis* CONTRA O *Aedes aegypti***. Porto Alegre, dezembro de 2016.

IBARRA, J.E., *et al.* Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**. 69: 5269–5274, 2003.

IBAL, J.C.; PHAM, H.Q.; PARK, C.E.; SHIN, J.H.. **Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification**. PLoS ONE, 2019.

MOMMA, Alberto Nobuoki **Rotulagem de plantas transgênicas e o agronegócio**. 2003.

MORE, Mangesh *et al.* **Species Specific Primer Designing – An Easy Method for Identification of *Bacillus thuringiensis***. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, vol. 5, out. 2011.

NASCIMENTOS, Erinaldo Sanches. **Ferramenta Web para Descoberta e Categorização de Genes *cry***. Paraná, 2017.

NOGUERA, Pedro A.; IBARRA, Jorge E. Detection of New *cry* Genes of *Bacillus thuringiensis* by Use of a Novel PCR *Primer* System. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6150–6155, setembro 2010.

NUNES, Sidemar Presotto. **O desenvolvimento da agricultura brasileira e mundial e a idéia de Desenvolvimento Rural**. Departamento de Estudos Socioeconômico Rurais, mar. 2007.

OLIWA-STASIAK, K. *et al.* Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. **Journal of Applied Microbiology**, fev. 2009.

PINTO, Laura Massochin Nunes; FIUZA, Lidia Mariana. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, 2008.

PINTO, Laura Massochin Nunes; FIUZA, Lidia Mariana. **Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Ciência Rural, Santa Maria, vol. 33, n.4, pag.699-702, jul-ago 2003.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. ***Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão**. Agrociência, vol. VII, pag. 1-10, 2003.

RICIETO, Ana Paula Scaramal *et al.* Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. **Can. J. Microbiol**, vol. 59, pag. 28–33, 2013.

ROEL, Antonia Railda. A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. Vol. 3, N. 4, p. 57-62, Mar. 2002.

SACCHI, C.T. *et al.* **Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis***. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 2002.

SANTOS, Welika Faria *et al.* Sequenciamento de dna: métodos e aplicações. **XIII Safety, Health and Environment World Congress**. Portugal, jul. 2013.

SCOLARI, Dante D. G.. **Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil**.

SILVA, J.S. *et al.* Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 59, p.1-6, 2015.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos de genética**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010.

VALICENTE, Fernando Hercos; TUELHER, Edmar de Souza. **Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Minas Gerais, dez. 2009

VALOIS, Afonso Celso Candeira. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, vol.18, n° 1, pag. 27-53, jan./abr. 2001.

YAMADA, S *et al.* “Clonagem e análise de sequência nucleotídica de *gyrB* de *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. anthracis* e sua aplicação na detecção de *B. cereus* no arroz.” **Microbiologia aplicada e ambiental** vol. 65,4 (1999): 1483-90.

ZAHA, Arnaldo *et al.* **Biologia Molecular básica**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZHENG, Jinshu *et al.* Differentiation of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* on the Basis of the *csaB* Gene Reflects Host Source. **Applied and Environmental Microbiology** pag. 3860–3863, jun. 2013.

SACCHI, Claudio T. *et al.* Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 8, No. 10, Oct. 2002.

KO, Kwan Soo *et al.* Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* Sequence Analysis and Multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, pag. 2908–2914, jul. 2003.

APÊNDICE I

TERMO DE CONCENTIMENTO PRÉVIO INFORMADO

Isolamento e caracterização de *Bacillus thuringiensis* (Bt) no oeste paranaense

1. Objetivos do estudo

Tem-se por objetivo de estudo isolar colônias de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para identificação de novos haplótipos do gene cry, na região oeste paranaense. Com análises moleculares é possível a identificação dos novos haplótipos que podem ser utilizadas na obtenção de novos bioinseticidas.

2. Etapas

Para conseguir esta identificação serão realizar protocolos de isolamento de bactéria, extração de DNA, amplificação de genes denominados cry e sequenciamento.

3. Equipe de trabalho

As análises serão realizadas na Universidade Tecnologia Federal do Paraná (UTFPR), pela acadêmica Sabrina Laís Pazdiora, e orientada pelo Professor Doutor Thiago Cintra Maniglia.

4. Resultados

Os resultados serão divulgados através de uma monografia para o Trabalho de Conclusão de Curso, este será divulgado no repositório da UTFPR.

5. Dados para contato

Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Acadêmica: Sabrina Laís Pazdiora
 Telefone: (45) 99949-5989
 E-mail:
 Orientador: Thiago Cintra Maniglia
 Telefone: (45) 33796817
 E-mail: thiagomaniglia@utfpr.edu.br

6. Assinaturas

Pelo presente termo, eu _____,
 RG: _____ e CPF: _____, atesto estar cientes e que
 concordar com a realização do projeto acima exposto e que foi garantido nosso
 direito de recusar sua realização durante o processo de obtenção do
 consentimento. Local de coleta é latitude: _____ e
 longitude _____.

Local _____, Data __/__/____

 Assinatura