

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DE ATIVIDADE DE
PEPTÍDEOS TIPO BACTERIOCINA
DE *Bacillus thuringiensis***

GUILHERME CORRÊA RASI

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Co-Orientadora: Dr. Rose Gomes Monnerat

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

“O homem sábio é aquele que sabe alguma coisa sobre tudo e tudo sobre alguma coisa. Estuda como se fosse viver eternamente e vive como se fosse morrer amanhã.”

Charles Chaplin

A minha melhor amiga,
Melhor compaheira e amada namorada, Mariana,

“Por sua causa eu tenho lindo sonhos para sonhar.

Por sua causa, minha vida está cheia de amor.”

Te Amo

Aos meus queridos pais, Paulo e Cynthia,

“A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que o trilhasse sem medo e cheio de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês.”

Dedico

Aos meus orientadores, Bergmann e Rose,

“Ofereço essa tese a vocês, que me ajudaram nas horas difíceis.

Por terem me proporcionado essa oportunidade maravilhosa

Por terem sido minha luz perante a escuridão que a ciência pode ser.”

Ofereço

Agradecimentos

A minha orientadora, Dra. Rose Gomes Monnerat, pela amizade, paciência, confiança, conselhos e ensinamentos e por ser um grande exemplo de pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Bergmann Morais Ribeiro, que conheço desde o primeiro semestre de Universidade, pela paciência, incentivo, crédito e contribuição na formação acadêmica.

Aos meus pais, Paulo e Cynthia, aos meus irmãos, Vitor e Paulo Henrique, pela ajuda, paciência e por me proporcionar momentos únicos. Amo vocês!

A minha namorada Mariana, por toda a ajuda, companheirismo, carinho, atenção, paciência e por estar sempre ao meu lado em momentos difíceis. Amo você!

A todos os meus amigos que me apoiaram durante essa empreitada. Todos vocês tem uma colaboração importante na minha vida. Sem vocês a minha vida seria muito sem graça.

A todos do LBE (Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas): Edylaine pelos momentos engraçados; Felipe, Vinícius, Murilo e Elias pela amizade e companheirismo; Zezinho por ter me ajudado muito na preparação de várias coisas no laboratório; Lunalva, Aldaléia, Eleni e Lilian por todas as conversas e companheirismo; Érica por toda a PACIÊNCIA e AJUDA que me deu durante o mestrado me ensinando procedimentos e me passando conhecimento.

Ao Dr. Paulo Roberto Queiroz, pela ajuda ao longo da tese em momentos difíceis. Você, muitas vezes, foi determinante na minha tese. A você desejo tudo do melhor.

Ao Dr. Octávio Franco, que me disponibilizou seu laboratório para a execução de vários procedimentos, principalmente na área de bioinformática.

As alunas do Dr. Octávio, Simone, Susana, Michele, Aline, Carol e Rodrigo, por toda a ajuda durante o meu tempo no laboratório de bioquímica.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para o sucesso dos meus trabalhos. Muito obrigado.

Índice

Dedicatória.....	iv
Oferecimento.....	v
Agradecimentos.....	vi
Índice.....	viii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas.....	xiv
Abreviações e símbolos.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
1 – Revisão Bibliográfica.....	1
1.1 – <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
1.1.1 – Histórico.....	3
1.1.2 – Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.1.2.1 – α -exotoxina.....	4
1.1.2.2 – β -exotoxina.....	4
1.1.2.3 – Vip.....	4
1.1.2.4 – δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt).....	5
1.1.3 – Importância comercial.....	8
1.2 – Bacteriocinas.....	9
1.2.1 – Definição.....	9

1.2.2 – Histórico.....	10
1.2.3 – Ecologia das bacteriocinas.....	11
1.2.4 – Organização estrutural dos genes e biologia molecular das bacteriocinas.....	14
1.2.5 – Imunidade e resistência a bacteriocinas.....	16
1.2.6 – Modo de ação.....	17
1.2.7 – Bacteriocinas de bactérias Gram negativas e positivas, e Archaea.....	21
1.2.7.1 – Bacteriocinas de Archaea.....	21
1.2.7.2 – Bacteriocinas de bactérias Gram negativas.....	21
1.2.7.3 – Bacteriocinas de bactérias Gram positivas.....	22
1.2.7.4 – Bacteriocinas de <i>Bacillus</i>	24
1.2.7.5 – Bacteriocinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
1.2.7.5.1 – Thuricina.....	25
1.2.7.5.2 – Tochicina.....	26
1.2.7.5.3 – Thuricina 7.....	27
1.2.7.5.4 – Entomocina 9.....	27
1.2.7.5.5 – Thuricina 439.....	28
1.2.7.5.6 – Bacthuricina F4.....	29
1.2.7.5.7 – Entomocina 110.....	29
1.2.7.5.8 – Thuricina 17.....	30
1.2.7.5.9 – Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 e Tolworthicina 524.....	31
1.2.7.5.10 – Thuricina S.....	32

1.2.7.5.11 – Thuricina H.....	33
1.2.8 – Aplicações industriais.....	34
2 – Justificativa.....	39
2.1 – Hipótese.....	39
2.2 – Objetivos.....	39
2.2.1 – Geral.....	39
2.2.2 – Específicos.....	40
3 – Material e Métodos.....	41
3.1 – Materiais.....	41
3.1.1 Químicos e fabricantes.....	41
3.1.2 – Materiais diversos.....	43
3.1.3 – Enzimas.....	43
3.1.4 – Plasmídeo.....	43
3.1.5 – Meios de cultura.....	43
3.1.6 – Soluções utilizadas em manipulações protéicas.....	44
3.1.7 – Soluções utilizadas em manipulações com DNA.....	44
3.1.8 – Estirpes de <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Bacillus sphaericus</i>	45
3.1.9 – Estirpes de outras bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas e Fungos.....	45
3.2 – Avaliação da produção de compostos antimicrobianos por estirpes de <i>Bacillus</i>	46
3.3 – Cinética de crescimento bacteriano.....	47
3.4 – Quantificação e perfil de proteínas.....	48

3.5 – Detecção de atividade antimicrobiana.....	48
3.6 – Efeito de enzimas proteolíticas, pH, temperatura e liofilização sobre o efeito antimicrobiano.....	51
3.7 – Clonagem e sequenciamento do gene da bacteriocina.....	53
3.8 – Análise <i>in silico</i> e SDS-PAGE de bacteriocina.....	55
4 – Resultados e Discussão.....	58
4.1 – Avaliação da produção de compostos antimicrobianos por estirpes de <i>Bacillus</i>	58
4.2 – Cinética de crescimento bacteriano.....	61
4.3 – Quantificação e perfil de proteínas.....	62
4.4 – Detecção de atividade antimicrobiana.....	64
4.5 – Efeito de enzimas proteolíticas, pH, temperatura e liofilização sobre o efeito antimicrobiano.....	68
4.6 – Clonagem e sequenciamento do gene da bacteriocina.....	72
4.7 – Análise <i>in silico</i> e SDS-PAGE de bacteriocina.....	82
Conclusões gerais e perspectivas.....	95
Referências Bibliográficas.....	97

Índice de Figuras

Figura 1 – Microscopia de contraste de fase de <i>B. thuringiensis</i>	2
Figura 2 – Modo de ação das toxinas Cry e Cyt.....	7
Figura 3 – Diagrama esquemático da biossíntese dos lantibióticos.....	15
Figura 4 – Diagrama esquemático da biossíntese de bacteriocinas da classe II.....	16
Figura 5 – Ilustração esquemática do modo de ação de bacteriocinas da classe I.....	19
Figura 6 – Modo de ação de bacteriocinas da classe II.....	20
Figura 7 – Modelo esquemático do experimento 1 de avaliação de compostos antimicrobianos por estirpe de <i>Bacillus</i>	46
Figura 8 – Modelo esquemático do experimento 2 de avaliação de compostos antimicrobianos por estirpe de <i>Bacillus</i>	47
Figura 9 – Cinética de crescimento da bactéria <i>B. thuringiensis</i> S1905 e pH do meio ao longo do crescimento.....	61
Figura 10 – Quantificação de proteínas secretadas durante o crescimento de células de <i>B. thuringiensis</i> S1905.....	62
Figura 11 – Perfil protéico do sobrenadante filtrado de <i>B. thuringiensis</i> S1905.....	63
Figura 12 – Produção do composto antimicrobiano por <i>B. thuringiensis</i> S1905 cultivado em meio LB líquido.....	64
Figura 13 – Análise do efeito da liofilização sobre o sobrenadante de <i>B. thuringiensis</i> S1905 através do “weel diffusion method”.....	72
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 1,0% com produto de amplificação indicando a presença de gene de bacteriocina por PCR de DNA de <i>B. thuringiensis</i> S1905	73
Figura 15A – Eletroforese em gel de agarose 1,0% da amplificação por PCR a partir do DNA dos clones recombinantes de <i>E. coli</i> DH5 α	74
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% com digestão dos plasmídeos pGEMThnS1905 A e B.....	76
Figura 17 – Sequência completa do gene da thuricina S1905.....	78
Figura 19 – Alinhamento das três ORF’s do gene da thuricina S1905 através do software Clustal W2.....	81

Figura 20– Organização genética dos genes estruturais da thuricina S1905.....	82
Figura 21 – Análise da bacteriocina thuricina S1905 pelo software TMHMM.....	85
Figura 22 – Análise de hidrofobicidade através do método Kyte & Doolittle.....	86
Figura 23 – Alinhamento das bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> através do software Clustal W2.....	86
Figura 24 – Alinhamento de quatro bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> através do software Clustal W2.....	87
Figura 25 – Análise das bacteriocinas thuricina H, thuricina S1905 e thuricina 17.....	88
Figura 26 – Estrutura tridimensional (modelo teórico) do peptídeo thuricina S1905.....	89
Figura 27 – Plot de Ramachandran para o modelo teórico do peptídeo thuricina S1905.....	89
Figura 28 – Superfície eletrostática da thuricina S1905.....	91
Figura 29 – SDS-PAGE com tris-tricina do sobrenadante filtrado e liofilizado de cultura de <i>B. thuringiensis</i> S1905.....	92

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.....	9
Tabela 2 – Modelo pedra-papel-tesoura de comunidades bacterianas.....	12
Tabela 3 – Utilização da bacteriocina nisina pelo mundo.....	35
Tabela 4 – Uso de culturas protetoras, em produtos à base de carne, para o controle de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
Tabela 5 – Espécies de bactérias e fungos testados para a determinação do espectro antimicrobiano.....	48
Tabela 6 – Soluções tampão para o teste em pH.....	51
Tabela 7 – Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho.....	53
Tabela 8 – Análise do efeito inibitório do sobrenadante de cultura das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> e <i>B. sphaericus</i>	58
Tabela 9 – Análise de presença de atividade nas estirpes de <i>B. thuringiensis</i> e <i>B. sphaericus</i> com discos de 0,5 cm.....	60
Tabela 10 – Microorganismos testados pelo composto antimicrobiano de S1905 de <i>B. thuringiensis</i>	65
Tabela 11 – Atividade residual do composto antimicrobiano de S1905 após incubação em diferentes temperaturas.....	70
Tabela 12 – Potenciais sítios de clivagem por enzimas ou substâncias químicas para a sequência da thuricina S1905.....	84
Tabela 13 – Principais características das bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> e cereína MRX1 de <i>B. cereus</i>	94

Abreviações e símbolos

Amp ⁺	resistente à ampicilina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
g	grama
h	hora
kb	quilobase = 1000 pares de base
kDa	quilodalton
L	Litro
M	Molar: mol/L
mg	miligrama
µg	micrograma = 10 ⁻⁶ gramas
mL	mililitro
µL	microlitro = 10 ⁻⁶ litro
µM	micromolar (micromol por litro)
min	minuto
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
pb	pares de bases
pH	potencial de hidrogênio
p/v	peso/volume

RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
Rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida com SDS
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil etilenodiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminoetano
UA	Unidade Arbitrária
v/v	volume/volume
°C	grau Celsius

Resumo

Atualmente, a preocupação dos consumidores com os efeitos adversos de aditivos sintéticos nos alimentos tem estimulado o consumo de alimentos naturais e orgânicos. A adição de compostos antimicrobianos no processamento de alimentos tem se tornado uma poderosa ferramenta. As bacteriocinas são uma atrativa opção para a resolução de parte desse problema. Esses peptídeos são, geralmente, termoestáveis e capazes de inibir vários organismos patogênicos que podem contaminar alimentos processados. O objetivo do trabalho foi identificar uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* que produza agentes antimicrobianos. Foi detectado um composto antimicrobiano produzido por *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S1905, que inicia a atividade antimicrobiana no fim da fase exponencial e apresenta seu ápice no meio da fase estacionária. Esse composto mostrou ser termotolerante, resistente a variações de pH, liofilização e alguns solventes orgânicos. A atividade antimicrobiana foi totalmente perdida quando tratada com proteinase K, revelando sua natureza protéica. Um fragmento de DNA contendo o gene da bacteriocina thuricina S1905 foi clonado e sequenciado, revelando que a sequência codifica 3 peptídeos idênticos de 40 aminoácidos com alta identidade com outras bacteriocinas de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Análises *in silico* desse peptídeo mostraram que ele possui massa molecular de 3147.6 Da, pI de 3.67 e uma grande região com possível motivo transmembrânico. Análise de superfície eletrostática mostrou que essa é uma bacteriocina aniônica e seu modo de ação ainda é desconhecido.

Abstract

Consumers concern about the unfavourable effects of sintetic additives on food is making the consumption of organic and natural food increase. The addition of antimicrobial compounds in food process has become a powerful tool. Bacteriocins are an attractive option for the resolution of this problem. These peptides are, generally, thermostable and can inhibit pathogens that can contaminate processed foods. The aim of this work was to identifie a *Bacillus thuringiensis* strain that produces antimicrobial compounds. The production of an antimicrobial compound was detected for the strain S1905 of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, which starts the activity in the end of the exponential phase and reaches its maximum in the middle of the stationary phase. This compound showed to be thermotolerant, resistant to pH variations, liophilization and organic solvents. The inhibitory activity was totally lost after proteinase K treatment, thereby revealing its proteinaceous nature. A DNA fragment containing the gene of the bacteriocin thuricin S1905 was cloned and sequenced, revealing that this sequence encodes three identical peptides of 40 amino acids each with high identity to others bacteriocins of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *In silico* analysis of this peptide showed that it has a molecular weight of 3147.6 Da, pI of 3.67 and a great hydrophobic region with a possible transmembranic motif. The electrostatic surface's analysis showed that this peptide is an anionic bacteriocin and its mode of action is still unknow.

1.0 Revisão Bibliográfica

1.1 – *Bacillus thuringiensis*

Membros do gênero *Bacillus* são bactérias Gram positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, esporogênicas, com divisão celular mediana e em formas de bastonete (DROBNIIEWSKI, 1993; SNEATH e HOLT, 1986). Crescem em temperaturas que variam entre 25°C e 37°C, apesar de existirem espécies que podem viver em temperaturas muito altas ou muito baixas. Algumas espécies podem também suportar extremos de acidez ou alcalinidade e assim podem viver entre os pH 2 e 10. A grande heterogeneidade do grupo se reflete na grande variedade de nichos ecológicos que as espécies de *Bacillus* podem ocupar.

O gênero *Bacillus* é dividido em três grandes grupos dependendo da morfologia do esporo (DROBNIIEWSKI, 1993). *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. megaterium* e *B. cereus* sorovar *mycoides* fazem parte do grupo 1. São bacilos que produzem esporos com formatos cilíndricos ou elipsoidais. Inclusões protoplasmáticas como poli-beta-hidroxibutirato são encontrados em espécies de grandes células, mas não em espécies com células pequenas. As espécies de células pequenas formam, assim, um subgrupo que contém *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. licheniformis* (GORDON *et al.*, 1973). A maioria das espécies de *Bacillus* com importância médica estão no grupo 1. O segundo grupo contém bactérias com esporângios inchados e esporos em forma de elipse com posição central ou terminal. Estão nesse grupo *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymixa*, *B. popillae*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* e *B. brevis*. O grupo 3 é composto por espécies de *B. sphaericus*. O esporângio é intumescido com esporos esféricos com posição terminal ou subterminal (DROBNIIEWSKI, 1993).

Entre as bactérias Gram positivas que compõem a microbiota intestinal de insetos existem aquelas que auxiliam no processo de digestão dos alimentos, porém outras são entomopatogênicas e são estudadas, principalmente, pelo potencial para o controle de pragas agrícolas e urbanas (PRIEST, 2000). Entre as bactérias com potencial para o controle biológico de pragas destaca-se *Bacillus thuringiensis* (Bt), bactéria em forma de bastonete que produz esporos e inclusões cristalinas, estruturas responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000) (Figura 1).

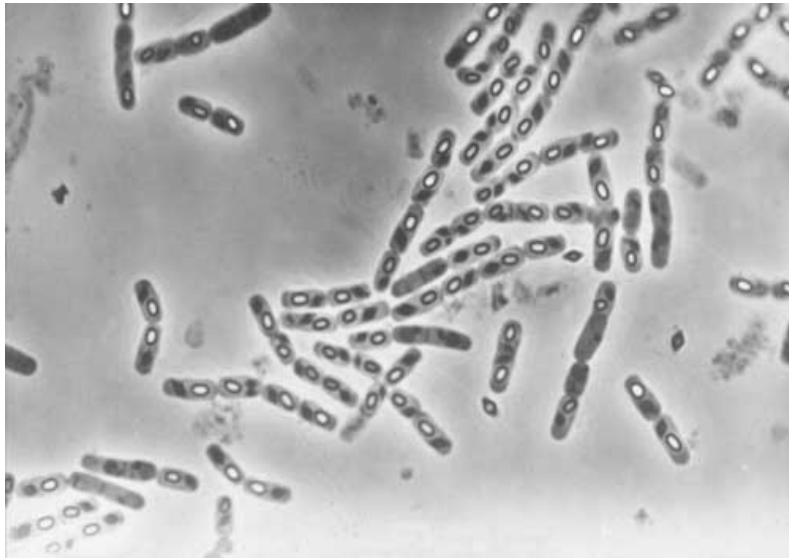


Figura 1. Microscopia de contraste de fase de *B. thuringiensis*. Dentro das células estão presentes o esporo (branco) e o cristal protéico (preto).

B. thuringiensis apresenta duas fases durante o seu ciclo de vida, uma caracterizada pelo crescimento vegetativo e outra pela esporulação. Durante a fase vegetativa, as bactérias se multiplicam por fissão binária, enquanto na esporulação ocorre a formação de esporos. Os esporos, quando encontrados em um ambiente favorável ao crescimento (meio com nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e temperatura em torno de 28°C e pH em torno de 7,0), podem germinar e iniciar o crescimento vegetativo.

B. thuringiensis é considerada uma bactéria cosmopolita por ter sido isolado de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de diferentes substratos como solo, água, folhas e insetos mortos. Entretanto, seu requerimento nutricional vitamínico e de aminoácidos, como o ácido glutâmico, sugere que as células vegetativas somente se reproduzem no interior dos insetos hospedeiros (SOBERON e BRAVO, 2001; MONNERAT e PRAÇA, 2006).

As inclusões cristalinas de Bt contêm proteínas denominadas delta-endotoxinas que, atualmente, formam uma família com mais de 340 membros, classificados em 55 grupos. Elas são produzidas pelas bactérias na forma de protoxina, porém, quando no intestino do inseto, são transformadas em peptídeos tóxicos pela ação do pH alcalino

intestinal e de proteases. A toxina, assim ativada, causa lise das células epiteliais e morte dos insetos (ARONSON *et al.*, 1986; MONNERAT e PRAÇA, 2006).

1.1.1 - Histórico

O primeiro isolamento de Bt foi realizado pelo japonês Shigetane Ishiwata em 1901, a partir de larvas mortas do bicho-da-seda (*Bombix mori*). Uma década depois, em 1911, Ernst Berliner cunhou o nome *Bacillus thuringiensis* depois de isolar uma estirpe a partir da lagarta da traça-da-farinha (*Anagasta kuehniella*) no distrito alemão de Thuringia (POLANCZYK e ALVES, 2003). Em 1915, Berliner descreveu a existência de um cristal, porém a atividade deste foi descoberta somente anos depois (UCSD, 2008).

Em 1927, Mattes desenvolveu a primeira preparação comercial de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* que era tóxica para várias espécies de Lepidoptera. Por causa do domínio do uso produtos químicos na agricultura, o Bt foi esquecido até metade dos anos 50, quando Hannay e Fitz-James redescobriram a inclusão paraesporal e que o cristal era constituído de proteína. Em 1954, Angus provou que o efeito inseticida era causado por causa da inclusão paraesporal separando a toxina dos esporos (KIM, 1993).

Até 1976 pesquisadores acreditavam que o Bt estava incluso em um restrito grupo de microorganismos, com um pequeno espectro de ação contra poucas espécies de lepidópteros e este era usado exclusivamente no controle de insetos pragas na agricultura. Porém, em 1977, descobriu-se uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* tóxica para larvas de mosquitos e de borrachudos (Diptera) (KIM, 1993). Desde então, estão sendo realizados inúmeros programas de seleção, visando o isolamento de estirpes tóxicas a outros insetos e atualmente são conhecidas estirpes tóxicas a insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, entre outras (POLANCZYK *et al.*, 2003).

1.1.2 - Toxinas produzidas por *B. thuringiensis*

1.1.2.1 - α -exotoxina

A α -exotoxina, também conhecida por fosfolipase C, lectinase ou fosfatidilcolina fosfolipase, é uma enzima que possui atividade citolítica quando atua sobre os fosfolípidos presentes nas membranas de diversos tipos celulares (FAUST; BULLA JR., 1982). Essa toxina é termolábil, solúvel em água e encontrada em sobrenadantes de culturas. É extremamente tóxica quando administrada via oral ou intra-hemocélica. A α -exotoxina pode, também, apresentar toxicidade a ratos e outros vertebrados, levando a degeneração e lise de hemócitos (KRIEG, 1971; HANSEN e SALAMITOU, 2000). O gene correspondente a essa toxina já foi clonado e sequenciado (LECHNER *et al.*, 1989).

1.1.2.2 - β -exotoxina

A β -exotoxina ou thuringiensina é uma toxina termoestável produzida por algumas estirpes de Bt durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. Existem dois tipos de β -exotoxina. A toxina do tipo I é um análogo de ATP composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 Da (FARKAS *et al.*, 1969). Essa toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase, por meio da competição pelo ATP, sendo altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e vertebrados, com efeitos mutagênicos e teratogênicos (SEBESTA *et al.*, 1981; HANSEN e SALAMITOU, 2000). A toxina do tipo II é um análogo de UTP e apresenta toxicidade superior a do tipo I, principalmente para coleópteros (LEVINSON *et al.*, 1990). Desde de 1970, os produtos comerciais baseados em Bt produtores dessa toxina foram substituídos por outros não produtoras de β -exotoxina (SEBESTA *et al.*, 1981; MONNERAT e PRAÇA, 2006).

1.1.2.3 - Vip

As protoxinas “Vip” (*vegetative insecticidal proteins*) são proteínas produzidas e secretadas por algumas estirpes de Bt. Essas proteínas são produzidas em etapas iniciais

do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de Bt, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (MONNERAT e BRAVO, 2000).

As proteínas Vip foram excluídas da nomenclatura Cry por não formarem cristais protéicos. Em concentrações letais, a Vip3A causa paralisia e lise das células epiteliais do intestino médio dos insetos. Essas manifestações físicas da intoxicação provocada pela Vip3A lembram aquelas das proteínas Cry (YU *et al.*, 1997). Essa toxina apresenta atividade somente contra larvas de lepidópteros. São produzidas e secretadas por algumas estirpes durante a fase vegetativa e de esporulação e apresentam massa molecular a partir de 88,5 kDa (LOGUERCIO *et al.*, 2002).

1.1.2.4 - δ - endotoxinas (proteínas Cry e Cyt)

Apresentam espectro de ação restrito a uma determinada ordem de insetos e podem ser definidas como uma inclusão protéica paraesporal (CRICKMORE *et al.*, 1998; MAAGD *et al.*, 2001). De acordo com HABIB e ANDRADE (1998) o cristal pode ser de forma bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou sem forma definida. MONNERAT e BRAVO (2000) relataram que o processo de formação do cristal está ligado à esporulação, em que essa estrutura é formada a partir do segundo estágio de esporulação e é liberado no momento em que as células são lisadas.

As proteínas Cry e Cyt pertencem a uma classe de proteínas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros (TFP), solúveis em água, o que permite modificações conformacionais para permitir a inserção ou a translocação destas proteínas na membrana celular do hospedeiro. Existem dois grupos de TFP: α -hélice toxinas, em que a região de α -hélice forma um poro através da membrana e β -barril toxinas que ao se inserir na membrana formam um β -barril composto de monômeros de grampos de folhas β -pregueadas (PARKER e FEIL, 2005).

O modo de ação (figura 2) de Bt ocorre da seguinte forma: as proteínas tóxicas Cry, que são codificadas pelos genes *cry* e responsáveis pela atividade inseticida, são sintetizadas durante a fase de esporulação e se acumulam na célula-mãe, na forma de inclusão cristalina. No final do processo de crescimento a célula se rompe e o cristal é

liberado. Os cristais ao serem ingeridos por larvas de insetos susceptíveis são solubilizados no intestino médio (pH alcalino), liberando uma ou mais proteínas Cry. Além disso é necessário um ambiente redutor já que as pontes dissulfeto são abundantes na metade C-terminal das proteínas de 130 kDa. O intestino médio da maioria das larvas de insetos susceptíveis (lepidopteros, dípteros e alguns coleopteros) apresenta alto pH e condições redutoras (KNOWLES, 1993).

Após os cristais ingeridos por larvas susceptíveis terem sido dissolvidos no ambiente alcalino do intestino, as protoxinas solúveis e inativas são clivadas por proteases do hospedeiro originando proteínas ativas de 60-70 kDa (BRAVO *et al.*, 2005). As proteínas ativas se ligam aos receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das larvas de insetos susceptíveis (de MAAGD *et al.*, 2001; BRAVO *et al.*, 2005). A inserção da toxina promove a formação de poros na região apical das microvilosidades. A união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo (MONNERAT e BRAVO, 2000; POLANCZYK *et al.*, 2004).

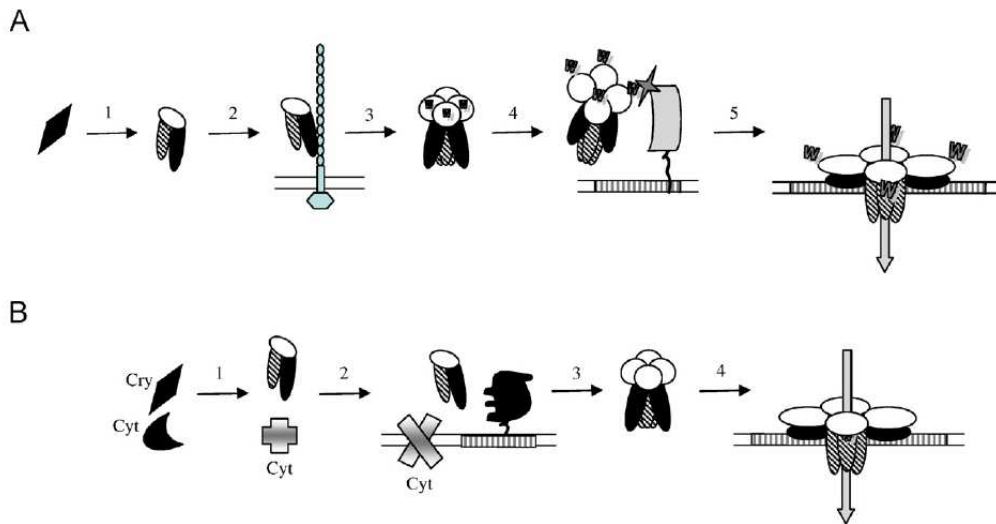


Figura 2. Modo de ação das toxinas Cry e Cyt. (A) Interação das toxinas Cry com diferentes receptores moleculares em larvas de lepidópteros (Caderina ou GCR). (1) Solubilização e ativação da proteína. (2) Ligação da toxina monomérica com o primeiro receptor, mudança conformacional da toxina e clivagem da hélice α -1. (3) Formação oligomérica. (4) Ligação da toxina ao segundo receptor (GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína. (5) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro. (B) Interação das toxinas Cry e Cyt em larvas de dípteros. (1) Solubilização e ativação das proteínas. (2) Inserção das toxinas Cyt na membrana e ligação das proteínas Cry aos receptores (ALP ou toxinas Cyt). (3) Indução da oligomerização das proteínas Cry. (4) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro (BRAVO *et al.*, 2007).

Grande parte dos estudos feitos sobre o modo de ação das toxinas Cry foram realizadas, principalmente, em lepidópteros (KNOWLES e DOW, 1993). Os sintomas que são observados após a ingestão dos cristais e dos esporos de Bt são: perda de apetite e abandono do alimento, vômito, diarreia, paralisia do intestino, paralisia total e morte (ARONSON *et al.*, 1986). Quando infectadas por Bt, as larvas perdem agilidade e o tegumento apresenta tonalidade marrom escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra (HABIB e ANDRADE, 1998; MONNERAT e BRAVO, 2000).

1.1.3 - Importância comercial

Os produtos à base de Bt constituem de 1% a 2% do mercado global de inseticidas, estimado em 8 bilhões de dólares por ano, representando 100 milhões de dólares em vendas anuais (NESTER *et al.*, 2002). Os bioinseticidas à base de Bt possuem como característica boa estabilidade visto que não necessitam de condições especiais de armazenamento. Existem, atualmente, aproximadamente 60 produtos à base de Bt no mundo (CERÓN, 2004).

Produtos à base dessa bactéria têm sido utilizados há mais de 50 anos e proporcionam inúmeras vantagens, tais como especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao meio ambiente, inocuidade aos mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (MONNERAT e BRAVO, 2000; CÁRDENAS *et al.*, 2001).

Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* se classificam em produtos de primeira geração (esporos e cristais), segunda geração (esporos e toxinas de estirpes com introdução de genes de δ -endotoxina de outra estirpe), terceira geração (bactérias recombinantes mortas, especialmente, *Pseudomonas fluorescens*) e quarta geração (quimeras de proteínas) (CERÓN, 2004).

O desenvolvimento de novos produtos à base de Bt é muito importante, já que diferentes formulações e a descoberta de estirpes com diferentes toxinas, podem aumentar a atividade tóxica e um melhor resultado do produto em condições ambientais (MEDEIROS *et al.*, 2006).

1.2 – Bacteriocinas

1.2.1 - Definição

Bacteriocinas podem ser definidas como peptídeos termoestáveis produzidos por bactéria que possuem atividade tóxica contra outras bactérias e para a qual a bactéria produtora apresenta um mecanismo de imunidade específico (COTTER *et al.*, 2005). Elas são sintetizadas pelos ribossomos e, em sua maioria, são compostos catiônicos que produzem poros nas células-alvo, interferindo no potencial de membrana e assim, causando a morte celular (OSCÁRIZ e PISABARRO, 2001). Duas características distinguem os antibióticos das bacteriocinas: bacteriocinas são sintetizadas por ribossomos e tem um espectro de ação reduzido, tóxico somente a bactérias relacionadas geneticamente à produtora (RILEY e WERTZ, 2002b). A tabela 1 mostra as diferenças entre antibióticos e bacteriocinas.

Tabela 1. Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos (modificado de CLEVELAND *et al.*, 2001).

Característica	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicação	Alimentos	Clínico
Síntese	Ribossomal	Metabólito secundário
Espectro de ação	Espectro pequeno (normalmente)	Espectro variado
Imunidade à célula produtora	Sim	Não
Resistência ou tolerância	Composição da membrana	Depende do modo de ação
Interações	Moléculas ancoradoras	Alvo específico
Modo de ação	Formações de poro	Variados
Toxicidade/efeitos colaterais	Não conhecido	Sim

O termo substância-tipo bacteriocina somente se aplica aos compostos antimicrobianos que possuem natureza protéica e que não estão completamente caracterizados ou não apresentam todas as características de bacteriocinas. Essas substâncias apresentam, geralmente, um espectro de ação maior, atuando contra algumas variedades de bactérias Gram positivas, Gram negativas e até contra algumas espécies de fungos (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

1.2.2 – Histórico

Desde os tempos de Louis Pasteur e Robert Koch acreditava-se na necessidade de se controlar microorganismos em nosso ambiente. A descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1929, resultou o uso de antibióticos terapêuticos por comunidades médicas e veterinárias para o combate a organismos causadores de doenças. Em 1676, Antonie van Leeuwenhoek documentou uma inibição onde o produto de um microorganismo inibiu o crescimento do outro (JOERGER *et al.*, 2000). Em 1877, Louis Pasteur e J.F. Joubert descreveram que a bactéria *Bacillus anthracis* crescia normalmente em urina estéril. Porém quando se inoculava algum tipo de bactéria ou ocorria algum tipo de contaminação notava-se a inibição do crescimento de *B. anthracis* (REEVES, 1965).

Nesta época surgiram algumas propostas de terapias de reposição para modificar a microbiota intestinal. Várias tentativas foram realizadas com o uso de bactérias produtoras de ácido láctico e de algumas linhagens de *E. coli*, que eram capazes de inibir o crescimento de, principalmente, *Salmonella typhi*. Em meados de 1916, chegou-se a distribuir uma linhagem de *E.coli* (Mutaflor) para o tratamento de disenteria. Porém esse tratamento foi descartado por não apresentar efetividade e nem identificar a natureza da substância envolvida (JACOB *et al.*, 1953).

Em 1925, o cientista Andrei Gratia observou que algumas linhagens de *E. coli* liberavam uma substância que apresentava um efeito antagônico sobre outras colônias do mesmo organismo. Foram descobertas 20 tipos de proteínas inibidoras de crescimento, que foram denominadas de colicinas. Alguns anos depois, novas observações mostraram que antimicrobianos do tipo colicina também podiam ser produzidos por outras bactérias e não somente pelos coliformes. Assim, em 1953,

JACOB *et al.* introduziram o termo mais genérico bacteriocinas para as proteínas antibióticas do tipo colicina.

Nas últimas décadas, a maioria das pesquisas limitavam-se às investigações de colicinas (bacteriocinas produzidas por membros da família *Enterobacteriaceae*). Entretanto, existe uma intensificação de pesquisas com bacteriocinas de bactérias Gram positivas, principalmente de bactérias ácido-láticas (DE VUYST e VANDAMME, 1994; RILEY e GORDON, 1999).

1.2.3 - Ecologia das bacteriocinas

Evolutivamente, a habilidade de síntese de bacteriocinas mostra-se vantajosa. Bacteriocinas podem servir como anti-competidores, possibilitando a entrada de uma estirpe em uma comunidade microbiana já estabelecida (LENSKI e RILEY, 2002; RILEY e GORDON, 1999). Podem também apresentar um papel defensivo, evitando a entrada de outras estirpes/espécies em um ambiente com estirpes/espécies já estabelecidas no nicho (RILEY e WERTZ, 2002b).

De acordo com RILEY (1998) o estudo de bacteriocinas em ambientes naturais, tais como, de *Lactobacillus plantarum* em azeitonas verdes e *Streptococcus mutans* na cavidade oral humana, indicou que existe uma vantagem competitiva entre estirpes produtoras e sensíveis às bacteriocinas. As oportunidades de sobrevivência de um organismo podem ser adquiridas eliminando um organismo competidor em seu nicho ecológico, onde a competição pode ser intensa, levando em conta a diversidade de espécies e o rápido crescimento das bactérias (DYKES, 1995). As bacteriocinas têm um papel fundamental na dinâmica populacional de bactérias (CHEN e HOOVER, 2003).

Recentemente, uma nova função foi proposta para as bacteriocinas de bactérias Gram positivas, no qual esses peptídeos exercem o quorum sensing (RILEY e WERTZ, 2002b). KAUFMANN *et al.* (2005), observaram que a N-homoserina lactona, um dos autoindutores usados por *Pseudomonas aeruginosa*, é também um agente bactericida. O autoindutor foi efetivo contra todas as bactérias Gram positivas testadas. Porém, *P. aeruginosa*, como outras bactérias Gram negativas, não foram afetadas por este

composto. O grupo dos lantibióticos (classe I) são classificados, atualmente, como um grupo de autoindutores com função antimicrobiana (KLEEREBEZEM, 2004).

Os modelos propostos atualmente para a ecologia de bacteriocinas têm considerado mais as realidades biológicas encontradas no meio ambiente (RILEY e WERTZ, 2002b). Muitos microbiologistas e ecologistas teóricos se baseiam nas comunidades de populações de *E. coli* produtoras de toxinas (colicinogênicas). O modelo de pedra-papel-tesoura, proposto por KERR *et al.* (2002), leva em consideração sistemas no qual não ocorram hierarquias competitivas, em comunidades com três espécies competidoras que apresentam uma relação similar ao jogo de pedra-papel-tesoura: a estirpe produtora invade o espaço da estirpe sensível; a estirpe sensível desloca a estirpe resistente e a estirpe resistente invade o espaço da estirpe produtora. Nesse padrão de interação, os ganhos locais feitos por uma estirpe é aproveitado, em pouco tempo, por outra estirpe. O resultado dessa balanceada competição é a manutenção da diversidade. Isso pode ocorrer pelo fato de tanto a produção da toxina quanto a resistência apresentarem um custo energético. Entretanto o custo para a resistência é menor do que o custo para a produção de toxina e, assim, se os custos para a resistência forem muito baixos ou muito altos a comunidade pode chegar ao colapso. A magnitude relativa desses custos será, portanto, crítica para as perspectivas de coexistência. Quando as interações e as dispersões deixam de ser locais, essa competição balanceada deixa de existir (KERR *et al.*, 2002). A tabela 2 representa o modelo de pedra-papel-tesoura em relação ao custo energético.

Tabela 2. Modelo pedra-papel-tesoura de comunidades bacterianas (adaptado de RILEY e WERTZ, 2002b).

Estirpe	Ganha contra	Perde contra
Produtora de toxina	Sensível	Resistente
Sensível	Resistente	Produtora
Resistente	Produtora	Sensível

CZÁRÁN *et al.* (2002) adicionaram ao modelo de pedra-papel-tesoura outras variáveis como diferentes sistemas de produção de toxinas e a possibilidade de ocorrência de mutações e transferência horizontal dos genes (transformação) de um elemento genético. Nesse estudo foi também considerado que o gasto energético para a produção da toxina é maior do que para a produção de resistência. Dois tipos de modelos foram propostos: equilíbrio de congelamento (“frozen state”) e hiperimunidade.

O equilíbrio de congelamento ocorre quando uma comunidade bacteriana não produtora de toxinas evolue e, através de mutações, passa a produzir toxinas. Essas mutações fazem o sistema se transformar em padrões bem distribuídos de estirpes monotóxicas. Todas as toxinas persistem no sistema, porém a maioria das colônias somente apresentam um gene da toxina e sua respectiva resistência. Após várias gerações o padrão espacial das colônias ainda é muito semelhante ao do início, ou seja, congelado. Não existe invasão entre colônias vizinhas pois elas apresentam a mesma toxina, e por isso, existe resistência entre as duas, ou porque o custo energético de ambas é igual (CZÁRÁN *et al.*, 2002).

O equilíbrio de hiperimunidade ocorre quando as simulações se iniciam de uma comunidade onde a estirpe mais frequente possui algumas toxinas e os genes de resistência desenvolvem um estado de equilíbrio de hiperimunidade, que apresenta baixa toxicidade, alta resistência e e padrões dinâmicos. Em uma comunidade que apresenta uma estirpe mais frequente, que possui mais de um tipo de toxina e resistência, a probabilidade de um equilíbrio entre as colônias é muito pequena. Assim, os padrões de colônias persistem por tempo suficiente para o surgimento de genes de toxina e resistência através de mutações, levando a um sistema de múltipla toxicidade. No estado de múltipla toxicidade, a perda de genes de toxina e a manutenção dos genes de resistência parece ser vantajosa, levando em consideração os custos energéticos, já que a produção é mais dispendiosa do que somente a resistência. Portanto, as colônias passam a apresentar poucos genes de toxinas e muitos genes de resistência (CZÁRÁN *et al.*, 2002).

1.2.4 - Organização estrutural dos genes e biologia molecular das bacteriocinas

Os genes responsáveis pela expressão de bacteriocinas encontram-se, geralmente, organizados em forma de “cluster”. Os clusters de bacteriocinas podem estar localizados em cromossomos, plasmídeos ou transposons. No grupo das bactérias lácticas a grande diversidade na produção de bacteriocinas ocorre devido ao fato dos genes estarem associados a elementos de DNA móveis como transposons e plasmídeos. Essas características podem ser exploradas para facilitar a produção de bacteriocinas heterólogas (COTTER *et al.*, 2005).

Nos grupos dos lantibióticos (classe I) os operons contêm genes que codificam o pré-peptídeo (LanA), enzimas de modificação estrutural (LanB, LanC,), proteases responsáveis pela remoção do peptídeo líder (LanP), proteína transportadora do tipo ABC (SCHNEIDER e HUNKE, 1998), proteínas de translocação de peptídeos (LanT), proteínas regulatórias (LanR) e proteínas responsáveis pela imunidade (LanI, FEG) (CHEN e HOOVER, 2003). A figura 3 mostra, de forma resumida, a organização e o processamento das bacteriocinas de classe I.

As bacteriocinas são sintetizadas, geralmente, como pré-peptídeos inativos que contêm uma sequência N-terminal líder (COTTER *et al.*, 2005). Em lantibióticos os aminoácidos serina, treonina e cisteína do pré-peptídeo passam por extensas modificações pós-traducionais para formar Lantionina/Metil Lantionina (CHEN; HOOVER, 2003). A sequência líder, geralmente, é clivada durante a exportação por um transportador ou, em menor frequência, pelo próprio sistema de secreção da célula (COTTER *et al.*, 2005).

A formação do pré-lantibiótico ocorre em uma reação de dois passos pós-traducionais (INGRAM, 1969;1970). Inicialmente, os aminoácidos serina e treonina são desidratados. As reações de modificações, os pré-lantibióticos modificados passam por um processo proteolítico para liberar o peptídeo líder, o que ativa a bacteriocina. Nos lantibióticos, o peptídeo líder é removido por uma protease de serina (Lan P) e, dependendo da localização dessa proteína, o processo de clivagem pode ocorrer antes ou depois do transporte do peptídeo pelo transportador ABC (LanT) (CHEN e HOOVER, 2003).

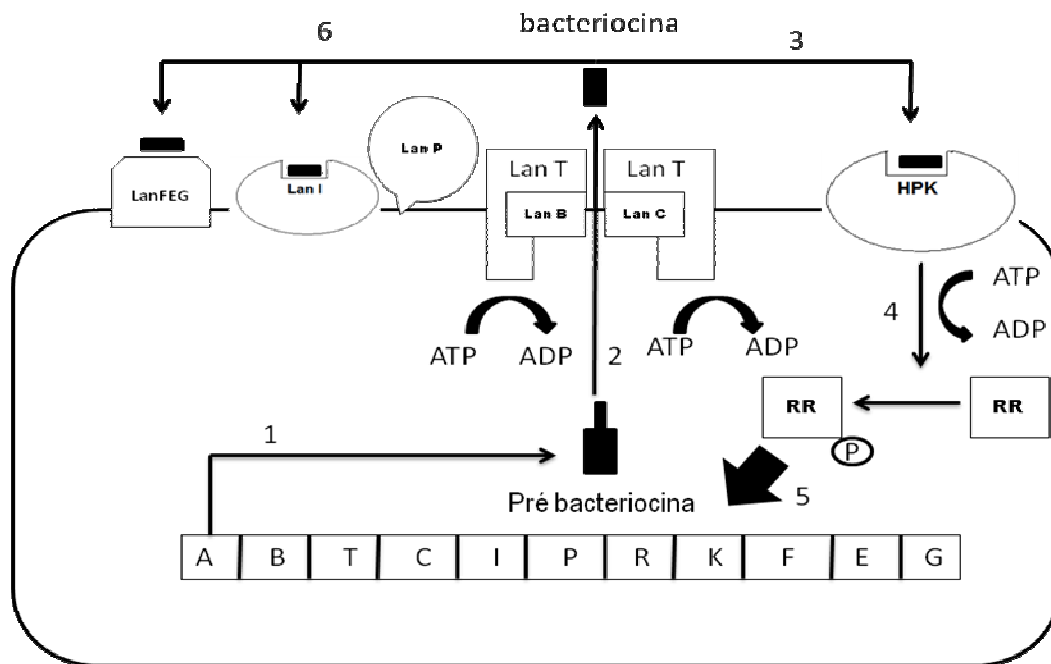


Figura 3 – Diagrama esquemático da biossíntese dos lantibióticos: (1) formação da pré-bacteriocina; (2) a pré-bacteriocina é modificada por LanB e LanC, translocada por LanT e processada por LanP; (3) proteína quinase de histidina (HPK), na presença da bacteriocina, se autofosforila; (4) o grupo fosforil (P) é transferido à um regulador de resposta citoplasmático (RR); (5) RR ativa a transcrição dos genes; e (6) a imunidade é conferida por LanI e LanFEG (modificado de CHEN e HOOVER, 2003).

Na classe II de bacteriocinas, os clusters contêm um gene estrutural que codifica o peptídeo, seguido de um gene de imunidade e genes do transportador ABC e proteínas acessórias (Figura 4). Nessa classe, as bacteriocinas são sintetizadas como um pré-peptídeo que contém N-terminal conservado e um sítio proteolítico com duas glicinas. Ao contrário dos lantibióticos, as bacteriocinas da classe II não sofrem extensivas modificações pós-traducionais. Formado o pré-peptídeo, este é clivado para retirar o peptídeo líder ao mesmo tempo em que é transportado para o meio extracelular (NES *et al.*, 1996). Nessa classe também ocorre a formação do fator de indução (IF – “Induction Factor), responsável pela ativação da transcrição dos genes (CHEN e HOOVER, 2003).

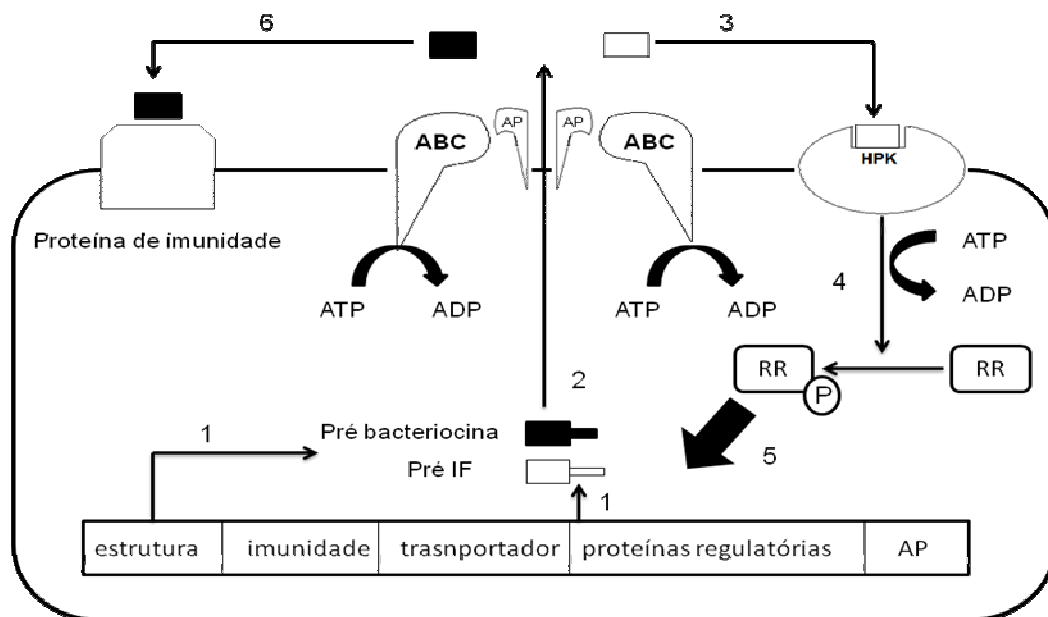


Figura 4. Diagrama esquemático da biossíntese de bacteriocinas da classe II: (1) Formação da pré-bacteriocina e do fator de indução (“Induction Factor” - IF); (2) A pré-bacteriocina e o IF são processados pela proteína acessória (“Accessory protein” – AP) e translocados por um transportador ABC, assim liberando a bacteriocina madura e o IF; (3) Proteína quinase de histidina (HPK) percebe a presença de IF e se autofosforila; (4) O grupo fosforil (P) é transferido para o regulador de resposta citoplasmático (RR); (5) O RR ativa a transcrição de genes e (6) Proteína produtora de imunidade que se liga à bacteriocina (modificado de CHEN e HOOVER, 2003).

1.2.5 - Imunidade e resistência à bacteriocinas

A imunidade às bacteriocinas é definida como a produção de proteínas que conferem resistência a estes peptídeos pela célula produtora. Existem vários mecanismos pelos quais a bactéria pode apresentar resistência (VENEMA *et al.*, 1995). Os genes que codificam as proteínas de imunidade estão geneticamente próximas de outros genes como os de estrutura e processamento das bacteriocinas. Geralmente, esses genes estão localizados dentro de um mesmo operon (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Em lantibióticos acreditava-se que a imunidade era conferida por um gene de imunidade, como o *nisI*, para a nisina e *spaI* para subtilina. A imunidade a essas bacteriocinas, porém, é o resultado da influência de diferentes proteínas, já que a

deleção de outros genes altera a imunidade do alvo. Duas proteínas estão envolvidas na resistência a lantibióticos: LanI e a LanFEG. LanI, localizada na parte externa da membrana atua, provavelmente, na prevenção da formação de poros. A proteína LanFEG atua de outra forma, removendo bacteriocinas que aderem à membrana plasmática, mantendo assim, o nível de bacteriocinas na membrana abaixo do nível crítico (CHEN; HOOVER, 2003). Estirpes de *Lactobacillus lactis* não produtoras e imunes à nisina, por exemplo, não apresentam o gene *nisI*, mas possuem sequências similares a *nisF*, *nisE* e *nisG*. Acredita-se que esses outros genes garantam a resistência a nisina, pois a deleção de *nisG* torna a célula menos resistente a esta bacteriocina (DUAN *et al.*, 1996).

Na classe II, o fenômeno da imunidade é mais simples. Um gene codifica a proteína de imunidade que é geralmente uma proteína de 50 a 150 aminoácidos que está associada à membrana citoplasmática (CLEVELAND *et al.*, 2001). Para a classe IIa (bacteriocinas do tipo pediocina), as proteínas que conferem imunidade à bacteriocina estão localizadas na parte intracelular da bactéria (MEYER *et al.*, 2009). Apesar de serem hidrofílicas, algumas proteínas de imunidade podem estar associadas com a parte interna da membrana celular (QUADRI *et al.*, 1995; DAYEM *et al.*, 1996). Entretanto, não há demonstração da interação direta entre proteínas de imunidade e as bacteriocinas. Acredita-se que a interação indireta entre as proteínas de imunidade e a bacteriocina é feita por meio do receptor de bacteriocinas na membrana. Essa ligação bloqueia a ação da bacteriocina (FIMLAND *et al.*, 2005). Apesar de haver inúmeros estudos com lactococcina A, uma proteína de imunidade da classe II, o mecanismo da imunidade dessa classe de bacteriocinas ainda é pouco conhecido (VENEMA *et al.*, 1995).

1.2.6 - Modo de ação

Bacteriocinas, principalmente da classe I, apresentam a inibição de células-alvo através da formação de poros que resultam na depleção do potencial transmembrânico e, possivelmente, o gradiente de pH, levando a uma consequente liberação de materiais celulares (CLEVELAND *et al.*, 2001). OREKEKE e MONTVILLE (1992) mostraram

que a nisina depende de alguns pré-requisitos, como o caráter alcalino e negativo do meio intracelular, para formar os poros.

Para a classe I, os receptores primários são os lipídeos aniônicos. Nisina por exemplo se liga a lipossomos aniônicos e esta interação permite que a nisina possa se difundir para outros lipossomos lentamente. A condutividade e estabilidade dos poros podem ser aumentadas por moléculas adjacentes, como o lipídeo II (precursor de peptideoglicano). O lipídeo II funciona como o principal transportador de subunidades de peptideoglicano do citoplasma para a parede celular. Assim as bacteriocinas podem agir de duas formas: ligando-se ao lipídeo II e impedindo a correta síntese da parede celular ou utilizando a molécula de lipídeo II como uma molécula ancoradora para iniciar o processo de inserção posterior a abertura do poro (Figura 5). Mersacidina, que também é um lantibiótico, se liga ao lipídeo II, inibindo a síntese de peptideoglicano, ao contrário da nisina que abre o poro na membrana. Células que tem uma depleção de lipídeos II são menos sensíveis à nisina e epidermina (BRÖTZ *et al.*, 1998). Lipídeo II também é receptor de reconhecimento da vancomicina (antibiótico) (CLEVELAND *et al.*, 2001). Bacteriocinas de classe II também dependem de fosfolipídeos aniônicos para interagir com a membrana. Bacteriocinas da classe IIa induzem a permeabilização da membrana da célula-alvo, provavelmente, formando poros seletivos na membrana e, assim, levam a depleção de ATP intracelular e a dissipação da força próton motora (DRIDER *et al.*, 2006).

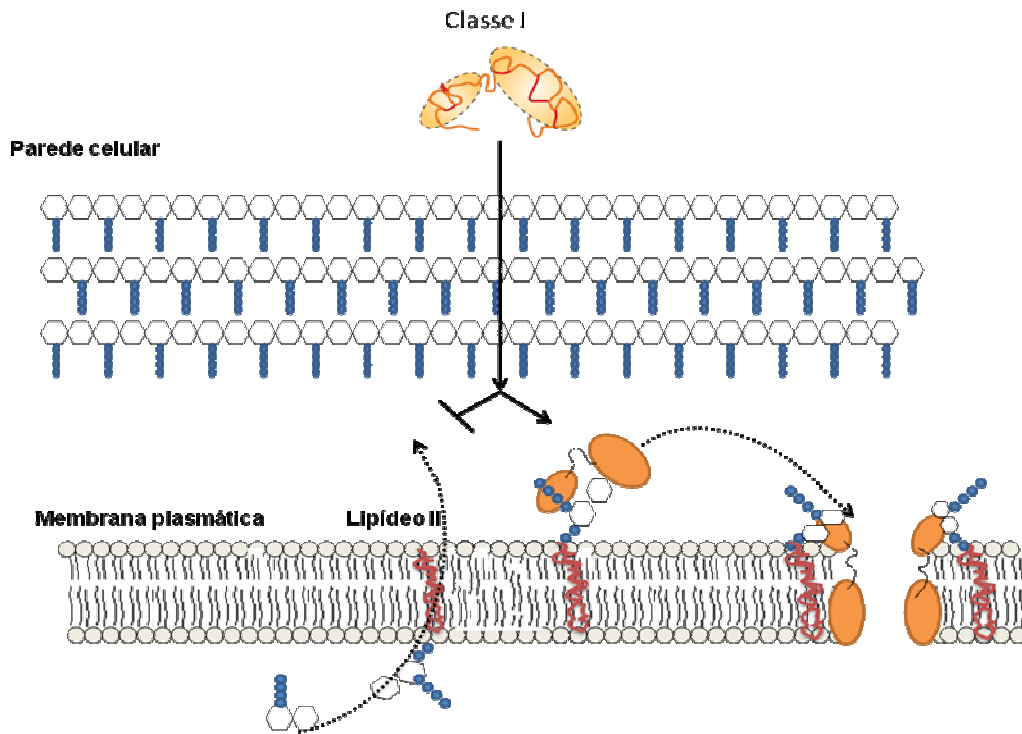


Figura 5. Ilustração esquemática do modo de ação de bacteriocinas da classe I (modificado de COTTER *et al.*, 2005).

Vários modelos foram propostos para a formação de poros na membrana. Existe um debate sobre os tipos de poros formados pela nisina, onde a maioria apoia os modelos de barril e cunha (CLEVELAND *et al.*, 2001). O modelo de cunha ocorre, provavelmente, na classe dos antibióticos, enquanto o modelo barril e tapete são propostos para as bacteriocinas de classe II (MOLL *et al.*, 1999). No modelo de cunha a bacteriocina se orienta paralelamente à superfície da membrana. Tanto ΔpH (diferença de pH) ácido como o $\Delta\psi$ (diferença de potencial de membrana) negativo são capazes de induzir a formação de poros. O C-terminal se insere na membrana e, assim, a bacteriocina inteira se transloca pela membrana (WINKOWSKY *et al.*, 1996). Na nisina, as dobras da molécula podem permitir que a parte C-terminal se ligue a membrana e, assim, ocorra a inserção na membrana. Muitas moléculas de nisina podem aumentar a desordem na bicamada lipídica formando poros entre proteínas e lipídeos. Essas estruturas são instáveis por causa de forças hidrofóbicas que podem orientar o rearranjo da bicamada lipídica (MOLL *et al.*, 1999).

As bacteriocinas da classe II formam um feixe de peptídeos α -hélices formando um poro em forma de barril (modelo de barril). A presença de um resíduo de aminoácido que rompe hélices pode facilitar a inserção de um peptídeo na membrana. No modelo de barril um feixe de peptídeos α -hélices hidrofílicos forma a parede interna do poro. A parte hidrofóbica dessas hélices fica em contato com as cadeias de ácidos graxos da membrana lipídica (MOLL *et al.*, 1999) (Figura 6). A maioria das bacteriocinas de classe II é ativada (inclusive em escala nanomolar) induzindo a permeabilização e a consequente perda de moléculas da célula-alvo (COTTER *et al.*, 2005).

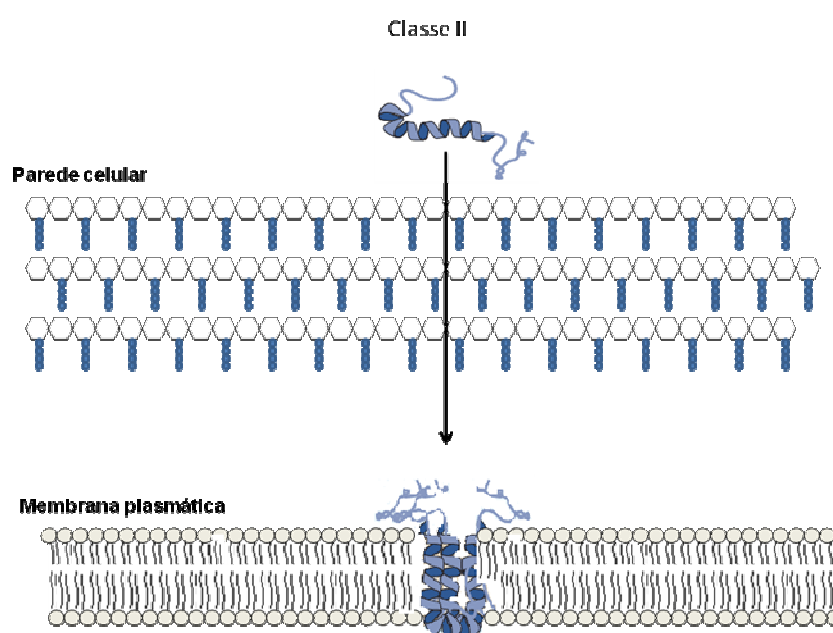


Figura 6. Modo de ação de bacteriocinas da classe II (modificado de COTTER *et al.*, 2005).

O modelo carpete é um modelo alternativo para explicar a formação de poros em bacteriocinas de classe II. Nesse modelo, peptídeos são orientados paralelamente a superfície da membrana e, conseqüentemente, interferem com a organização da membrana sem formar um agregado de peptídeos. Quando a quantidade de peptídeos for suficiente, a membrana colapsa temporariamente devido a uma forte mobilização de fosfolípidos, o que resulta em uma permeabilidade local (MOLL *et al.*, 1999).

1.2.7 - Bacteriocinas de bactérias Gram negativas e positivas, e Archaea

1.2.7.1 - Bacteriocinas de Archaea

As Archaea produzem um tipo de bacteriocina denominada archaeocinas. A halocina, produzido por Halobacterias, é o único tipo caracterizado. A primeira halocina descoberta foi a S8, um peptídeo hidrofóbico composto de 36 aminoácidos (PRICE e SHAND, 2000). Além da S8 outras bacteriocinas de Archaea foram caracterizadas, tais como, a H4 e H6 (RILEY, 1998).

As halocinas apresentam, aparentemente, o mesmo papel das tradicionais bacteriocinas em suas populações. As halocinas são produzidas quando a célula entra na fase estacionária. Ao se encontrar em uma fase de recursos limitados, as células produtoras de halocinas podem lisar as células sensíveis e, assim, enriquecer o meio com nutrientes. A estabilidade das halocinas pode ajudar a explicar porque poucas espécies habitam ambientes hipersalinos (PRICE e SHAND, 2000).

1.2.7.2 - Bacteriocinas de bactérias Gram negativas

Em bactérias Gram negativas, a bacteriocina mais estudada é a colicina, produzida por *E. coli*. Desde sua descoberta, as colicinas passaram a ser um modelo para investigação de mecanismos da estrutura, função, organização genética, ecologia e evolução de bacteriocinas (CASCALES *et al.*, 2007). Todas as bacteriocinas de bactérias Gram negativas, incluindo as colicinas, são proteínas de alta massa molecular, no qual variam, dependendo da função entre, aproximadamente, 100 e 700 aminoácidos (RILEY e WERTZ, 2002). Essas bacteriocinas são encontradas em um de dois tipos de plasmídeos colicinogênicos. O tipo A de plasmídeo é pequeno (6 a 10 kb) e presente em várias cópias por célula. O tipo B são monocópias de plasmídeo de 40 kb que carregam vários genes e possuem a capacidade de conjugação (PUGSLEY e OUDEGA, 1987). Os genes de colicinas apresentam organização em operon, compostos pelo gene do peptídeo, o gene de imunidade e o gene de lise. Este último codifica uma proteína envolvida na liberação de colicina pela lise da célula produtora. A produção de colicina é mediada pelo regulon SOS e, assim, é produzida principalmente em condições de stress. A produção da toxina é letal para o produtor e para células vizinhas que são

sensíveis a colicina. O modo de ação de bacteriocinas de bactérias Gram negativas podem ocorrer através da formação de poros ou pela atividade de nuclease contra DNA, RNA ribossômico e RNA transportador (RILEY e WERTZ, 2002b).

Apesar das colicinas serem as bacteriocinas representativas do grupo das Gram negativas, outras bacteriocinas como a piocina (*Pseudomonas aeruginosa*) e bacteriocinas de *Serratia marcesens* também são estudadas. Ambas são bem similares às colicinas, porém mostram algumas diferenças. Os genes da piocina são encontrados em cromossomos (SANO *et al.*, 1990). Já os genes das bacteriocinas de *S. marcesens* podem ser encontrados em plasmídeos ou em cromossomos.

A classificação de bacteriocinas de bactérias Gram negativas foram elaboradas por KOLTER e MORENO (1992), que introduziram uma classificação que distingue lantibióticos, não lantibióticos termoestáveis, colicinas e microcinas. Colicinas e microcinas são classificadas através de sua massa molecular e são compostos produzidos por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que são ativos contra outras bactérias Gram negativas.

1.2.7.3 - Bacteriocinas de bactérias Gram positivas

Bacteriocinas de bactérias Gram positivas são mais abundantes e mais diversificadas que as de bactérias Gram negativas. De fato, a maioria dos estudos sobre atividade de bacteriocinas são feitos com bactérias Gram positivas. É provável que o crescente interesse em bacteriocinas de Gram positivas seja uma resposta à potencial aplicação desses agentes na preservação de alimentos e no tratamento de infecções bacterianas (JACK *et al.*, 1995). As bacteriocinas de bactérias Gram positivas são similares a peptídeos antimicrobianos produzidos por eucariotos e geralmente são catiônicos, anfipáticos, permeadores de membrana e variam de 2 a 6 kDa (HENG *et al.*, 2006).

As bacteriocinas de Gram positivas diferem das Gram negativas em dois quesitos: (1) a produção de bacteriocina não é letal como ocorre com as Gram negativas; (2) Bactérias Gram positivas desenvolveram um sistema de regulação específica (NES *et al.*, 1996; RILEY e WERTZ, 2002b).

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são as mais caracterizadas em detalhes do grupo (CINTAS *et al.*, 2001). Muitas espécies de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) apresentam antagonismos com outras bactérias, incluindo espécies patogênicas (McMULLEN e STILES, 1996). Essas bactérias de ácido láctico são utilizadas há séculos na fermentação de alimentos, pois em parte elas conseguem impedir o crescimento de microorganismos patogênicos e contaminantes (CHEIGH e PYUN, 2005). A bacteriocina mais conhecida desse grupo é a nisina. Nisina tem seu uso aprovado em mais de 40 países por mais de 50 anos (CLEVELAND *et al.*, 2001). Ela é produzida pela bactéria *Lactococcus lactis* e inibe o crescimento de bactérias Gram positivas como *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, entre outras (RILEY e WERTZ, 2002; CHEN e HOOVER, 2003).

Vários critérios de classificação tem sido utilizados para agrupar esses diferentes compostos antimicrobianos produzido por bactérias. Uma delas é a classificação proposta por KLAENHAMMER (1993), no qual o autor separa bacteriocinas em quatro classes de acordo com sua massa molecular, termoestabilidade, sensibilidade enzimática, presença de aminoácidos modificados pós-traducionalmente e modo de ação.

A classe I é chamada de lantibióticos e tem como características principais o pequeno tamanho dos peptídeos (<5 kDa, 19-38 aminoácidos), presença dos aminoácidos lantionina (Lan), α -metillantionina (MeLan), dehidroalanina e dehidrobutirina. Essa classe também é subdividida, por alguns autores, em tipo A e tipo B, de acordo com a estrutura química e atividade antimicrobiana. Os lantibióticos do tipo A são peptídeos alongados com uma carga positiva que exercem a função de formação de poros em membranas. Exemplos de lantibióticos do tipo I são a nisina, produzida por *Lactobacillus lactis*, e a epidermina, produzido por *Staphylococcus epidermidis*. Os lantibióticos do tipo B são peptídeos globulares e pequenos, carregados negativamente, ou que não apresentam carga. Um exemplo de lantibióticos do tipo B é a mersacidina, produzida pelo *B. subtilis*. É válido lembrar que a subclassificação dos lantibióticos é complexa devido suas estruturas protéicas (CHEN e HOOVER, 2003; COTTER *et al.*, 2005).

A classe II de bacteriocinas tem como característica o tamanho pequeno (<10 kDa), termoestabilidade, peptídeos sem o aminoácido lantionina (Lan) e a ausência de extensas modificações pós-traducionais (COTTER *et al.*, 2005). Essa classe é subdividida em 3 grupos: IIa, IIb e IIc. A classe IIa apresenta peptídeos que possuem uma sequência N-terminal consenso YGNGV(X)C(X)₄C(X)V(X)₄A (Drider *et al.*, 2006). Este subgrupo tem chamado atenção por sua toxicidade contra *Listeria* (ENNAHAR *et al.*, 2000b). A classe IIb contém bacteriocinas com dois peptídeos diferentes. Estes peptídeos são únicos e totalmente diferentes um do outro e a atividade depende da presença dos dois peptídeos em quantidades iguais (OPPEGARD *et al.*, 2007). A classe IIc consiste em bacteriocinas cíclicas, onde a porção N e C terminais são ligadas covalentemente formando uma estrutura cíclica (COTTER *et al.*, 2005). Bacteriocinas que são constituídas por um peptídeo linear que não apresentam similaridade com bacteriocinas do tipo pediocina (classe IIa) fazem parte da classe IId (COTTER *et al.*, 2005).

As bacteriocinas de classe III não estão completamente caracterizadas. É uma classe que tem como representantes proteínas maiores (> 30 kDa) e termosensíveis. Poucas bacteriocinas dessa classe foram caracterizadas. O seu mecanismo de ação é diferente das outras, pois ela age por meio da lise da célula sensível pela hidrólise da parede celular. (COTTER *et al.*, 2005). Há ainda uma classe IV de bacteriocinas, na qual os peptídeos requerem a presença de moléculas de lipídeos ou carboidratos (KLAENHAMMER, 1993).

1.2.7.4 - Bacteriocinas de *Bacillus*

A produção de bacteriocinas ou substâncias similares (BLIS –Substâncias inibitórias tipo bacteriocinas) foram descritas para várias espécies do gênero *Bacillus*, tais como *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. stearothermophilum*, *B. licheniformis*, *B. thermoleovorans* entre outros (SHAFIA, 1966; BRADLEY, 1967; NOVOTNY e PERRY., 1992; BIZANI *et al.*, 2005; KAMOUN *et al.*, 2005; CHERIF *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2006; SEBEI *et al.*, 2007). Dentre essas, as mais estudadas são a subtilina (*B. subtilis*) e a coagulina (*B. coagulans* I) (CHERIF *et al.*, 2006).

Subtilina é um peptídeo catiônico com ação antibiótica produzido por *Bacillus subtilis*. É um peptídeo que faz parte da classe I de bacteriocinas, os lantibióticos, pois apresenta extensas modificações pós traducionais (SCHÜLLER *et al.*, 1989). A subtilina madura contém uma série de aminoácidos não usuais, tais como, serina/treonina desidratadas e pontes de lantionina e tioéter(β -metil) (STEIN *et al.*, 2002). Subtilina tem alta atividade inibitória contra várias espécies de bactérias Gram positivas, tais como propionibacterias staphylococcus, clostrídios, enterococcus e streptococcus (KLEEREBEZEM, 2004).

Coagulina é uma bacteriocina encontrada no sobrenadante de culturas de *B. coagulans*, uma bactéria Gram e catalase positivas com capacidade de crescimento a 55 °C e de produção de ácido láctico por meio de uma via homofermentativa. Ela é uma bacteriocina anti-listérica que pertence à família das pediocinas. Tem entre 3 e 4 kDa, é produzida durante a fase log de crescimento bacteriano e apresenta estabilidade a variações de pH e temperatura (HYRONIMUS *et al.*, 1998).

1.2.7.5 - Bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*

As thuricinas, como são normalmente denominadas as bacteriocinas produzidas por *B. thuringiensis*, apresentam um variado espectro de ação. Elas foram estudadas devido à sua ação bacteriolítica ou bacteriostática, contra várias espécies de bactérias como *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, entre outra espécies de importância alimentar e clínica (PAIK *et al.*, 1997; CHERIF *et al.*, 2001; AHERN *et al.*, 2003; Cherif *et al.*, 2003; KAMOUN *et al.*, 2005; BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007; CHEMINI *et al.*, 2007; CHERIF *et al.*, 2008). As thuricinas de *B. thuringiensis* caracterizadas são:

1.2.7.5.1 – Thuricina

A primeira bacteriocina de *B. thuringiensis* caracterizada foi a thuricina. A thuricina é produzida pela bactéria *B. thuringiensis thuringiensis* HD-2. Essa bacteriocina possui efeito inibitório para 46 estirpes de *B. thuringiensis* e também para outras espécies de bactérias Gram positivas. Ela não possui efeito inibitório para espécies de

bactérias Gram negativas. É uma proteína de aproximadamente 9,5 kDa. Quando tratada com quimotripsina, pronase, subtilisina, tripsina e calor a 96 °C perde ou reduz seu efeito inibitório. Quando submetido a tratamento com lisozima, fosfolipase C, papaína, peptidase ou solventes orgânicos manteve a atividade inibitória (FAVRET e YOUSTEN, 1989).

1.2.7.5.2 – Tochicina

A segunda bacteriocina de *B. thuringiensis* descrita foi a tochicina, bacteriocina produzida por *B. thuringiensis tochiensis* HD868 (PAIK *et al.*, 1997). Essa proteína foi testada contra várias subespécies diferentes de *B. thuringiensis* e todas foram inibidas pela tochicina, exceto ela mesma. Ela também inibe *Bacillus cereus* e *Leuconostoc mesenteroides*. Não tem efeito inibitório em espécies de bactérias Gram negativa como *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas campestris* ou efeito inibitório em algumas espécies de fungos como *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (PAIK *et al.*, 1997).

A produção de tochicina é detectada no meio da fase log de crescimento e atinge seu ápice de produção no início da fase estacionária. Essa queda de síntese pode estar relacionada com a indução da esporulação. Ela possui tanto efeito bactericida como efeito bacteriostático. Quando tratada com proteinase K perde a atividade, sugerindo que a tochicina seja de natureza protéica. Teste com outras enzimas como tripsina, quimotripsina, lipase II e lipase VII não mostraram perda ou redução de atividade. Esse composto é estável entre o pH 3.0 e 9.0. Suporta temperaturas de 90°C por 30 minutos. Quando aquecida a 100°C por 30 minutos ou 120°C por 15 minutos perde a atividade. O seu tamanho é de aproximadamente 10,5 kDa, apesar dessa proteína não ter sido purificada ainda (PAIK *et al.*, 1997).

1.2.7.5.3 - Thuricina 7

Thuricina 7 é a bacteriocina produzida por *B. thuringiensis* BMG 1.7. Ela não é detectada durante a fase exponencial e sim no final desta, alcançando o pico de produção no meio da fase estacionária (CHERIF *et al.*, 2001).

Essa bacteriocina é sensível a proteinase K e tem estabilidade nos pHs 3.0 a 9.0. Quando submetida a temperatura de 90° C por 30 minutos apresenta atividade residual de 90%. Tem aproximadamente 11,6 kDa e sua atividade é bactericida. Entre as estirpes testadas destaca-se a inibição de várias estirpes de *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenssthepanensis*. Inibe também o crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* (CHERIF *et al.*, 2001).

1.2.7.5.4 – Entomocina 9

CHERIF *et al.* (2003) testou 41 estirpes de *B. thuringiensis* quanto à produção de bacteriocina. *B. thuringiensis entomocidus* HD9 foi selecionada por ter inibido 32 das 41 estirpes testadas. Entomocina 9 inibiu 80 de 96 estirpes do grupo de *B. cereus*, todas as estirpes testadas de espécies de *Lactobacillus* e *Listeria monocytogenes*, duas estirpes de *Lactococcus lactis*, uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa*, uma estirpe de *Aspergillus nidulans* e uma estirpe de *Fusarium gramineis*. Não foi detectada atividade contra *E. coli*, *S. aureus*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. A produção dessa bacteriocina começa no meio da fase exponencial, aproximadamente com 5h de crescimento, e atinge o seu máximo no começo da fase estacionária.

Entomocina 9 é sensível a proteinase K, o que sugere que sua composição seja protéica. Ela é termoestável retendo aproximadamente 100 e 90% de atividade após incubação a 85 e 95° C por 30 minutos, respectivamente. Ela reteve mais de 72% de atividade quando submetida a 121° C por 20 minutos. Incubação em tampões com pH entre 3.0 e 9.0 e liofilização do sobrenadante não afetam a atividade da proteína. Ela tem aproximadamente 12.44 kDa e atividade bactericida (CHERIF *et al.*, 2003).

1.2.7.5.5 – Thuricina 439

Thuricina 439 tem efeito inibitório em algumas estirpes de *B. thuringiensis* e *B. cereus* e também em *Listeria innocua* 4202. Não apresenta efeito inibitório em estirpes de *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, algumas espécies do gênero *Clostridium*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus lactis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e algumas espécies de *Pseudomonas*. Os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium roquefortii* também não sofrem inibição por essa bacteriocina. A produção de bacteriocina ocorre durante o término da fase exponencial, coincidindo com o início da fase de esporulação. A atividade é mantida durante a fase estacionária. A atividade da thuricina 439 é bactericida (AHERN *et al.*, 2003).

Proteinase K e pronase E eliminam o efeito inibitório dessa bacteriocina. Até 80° C não há perda de atividade. A perda total de atividade ocorre com incubação a 121° C por 15 minutos. O armazenamento em baixas temperaturas não altera a atividade da bacteriocina. Thuricina 439 mantém sua atividade entre pH's 2 e 9 (AHERN *et al.*, 2003).

A purificação de culturas de *B. thuringiensis* B439 revela que existem 2 picos principais denominados de thuricina 439A e 439B. A massa molecular, de acordo com a espectrometria de massa da thuricina 439A e 439B é de 2919.9 Da e 2803.8 Da, respectivamente. A sequência N-terminal das thuricinas 439A e 439B são iguais. Cada fração apresenta 20 aminoácidos: GWVAXVGAXGTVVVLASGGVV, onde X é um resíduo não determinado. Essa bacteriocina não apresenta similaridade com qualquer bacteriocina sequenciada e ela não pode ser classificada em descrito na literatura (AHERN *et al.*, 2003).

1.2.7.5.6 – Bacthuricina F4

Bacthuricina F4 é a bacteriocina produzida por *B. thuringiensis* BUPM4. É ativa contra algumas estirpes de *Bacillus* como *B. thuringiensis kustarki* HD1, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. ureus* e *B. licheniformes* e ativa contra *S. aureus*, *Brevibacterium flavum* e *Klebsiella pneumoniae*. Não possui atividade contra *E. coli*, *Enterobacter cloacae*,

Pasteurella haemolytica, *Pseudomonas stutzeri*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosum* e *Enterococcus faecium* (KAMOON *et al.*, 2005).

A incubação de culturas de *B. thuringiensis* BUPM4 a diferentes temperaturas por 30 minutos mostra que essa bacteriocina é estável até 70° C. Pode preservar 20% de sua atividade após incubação à 90° C por 30 minutos. Quanto à variação de pH consegue manter a atividade entre os pH's 3 a 7. Acima de 7 a atividade diminui. Essa bacteriocina também se mostrou estável para a liofilização. Proteinase K e alcalase eliminam com a atividade da bacturicina F4, enquanto a neutrase diminui a atividade em 25%. A maior atividade dessa bacteriocina é alcançada no meio da fase estacionária e ela apresenta efeito bactericida (KAMOON *et al.*, 2005).

O sobredante contendo bacturicina F4 foi purificado através de HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”). Após a purificação da amostra ela foi submetida a espectrometria de massa e essa análise revelou um pico principal com 3160.05 Da. A análise da composição dos aminoácidos revelou somente 22 aminoácidos, no qual triptofano e cisteína não foram detectados devido ao método utilizado. A sequência N-terminal do peptídeo foi obtida através de degradação de Edman. A sequência contém 8 aminoácidos: DWTXWSXL, onde X representa resíduo não determinado (KAMOON *et al.*, 2005).

1.2.7.5.7– Entomocina 110

CHERIF *et al.* (2008) testaram 120 estirpes de *B. thuringiensis*, obtidas de amostras de diferentes coleções, quanto à produção de bacteriocina. *B. thuringiensis entomocidus* HD110 foi selecionada por causa de sua alta atividade de inibição e sua relação filogenética com outra estirpe produtora de bacteriocinas, *B. thuringiensis entomocidus* HD9. Ela foi testada contra várias espécies de *Bacillus*. Apresentou atividade contra *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. coagulans* e *B. megaterium*. Outras espécies foram inibidas, tais como *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus larvae*, *Listeria monocytogenes* e *Lactococcus lactis*. Não apresentou atividade contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e

Streptococcus pyogenes. A produção de entomocina 110 se inicia na fase exponencial e alcança seu ápice no começo da fase estacionária (CHERIF *et al.*, 2008).

Entomocina 110 quando incubada com proteinase K perde totalmente a atividade. Quanto à termoestabilidade, entomocina 110 mantém 53% de sua atividade após 20 minutos de incubação à 121° C. A incubação dessa bacteriocina em pH's 3.0 a 9.0 e com 10% (v/v) de solventes orgânicos (acetona, butanol, metanol e tolueno) não afetaram sua atividade. Experimentos demonstram que essa bacteriocina tem efeito bactericida e bacteriolítico. A eletroforese de gel em poliacrilamida de Tris-Tricina demonstra que esse peptídeo apresenta uma massa molecular de 7,5 kDa (CHERIF *et al.*, 2008).

1.2.7.5.8 – Thuricina 17

B. thuringiensis NEB17 produz uma bacteriocina denominada thuricina 17. Essa bacteriocina foi testada contra vários microorganismos. Ela é eficaz contra várias espécies de *Bacillus*, assim como *Escherichia coli* MM294, *Brevibacillus brevis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus dendritiformis* (GRAY *et al.*, 2006a).

O tratamento com 2 mg/mL de protease acaba com a atividade total da thuricina 17. Quando tratado com 1 mg/mL de proteinase K e protease, ocorre uma perda parcial de atividade. Catalase e α -amilase não provocaram mudanças na atividade da thuricina 17. Entre os pH's 1.0 e 9.0 a atividade é mantida. Acima de pH 9.0 a atividade é totalmente perdida. A atividade também não se altera até 100° C. Quando incubado à 121° C por 5 minutos, thuricina 17 perde totalmente sua atividade (GRAY *et al.*, 2006a).

Além do efeito inibitório da thuricina 17, essa bacteriocina quando aplicada a folha e raiz estimula diretamente o crescimento da planta, tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas. Essa bacteriocina aumenta o número de nódulos, concentração de nitrogênio e o nitrogênio total fixado. Quando aplicado nas folhas na forma de spray aumenta o tamanho da folha, aumenta as taxas de fotossíntese, deixa a folha mais verde e aumenta o acúmulo de matéria seca (LEE, K.D. *et al.*, 2009).

Através de técnicas de PCR foi possível a descoberta da sequência nucleotídica da região downstream e upstream do gene que codifica a thuricina 17. Existem 3 cópias do gene e cada cópia codifica um peptídeo de 39 aminoácidos no qual o peptídeo sinal com 8 aminoácidos é clivado para liberar um peptídeo de 31 aminoácidos. A sequência nucleotídica está disponível no GenBank (número de acesso : FJ159242) (LEE, K.D. *et al.*, 2009). A análise por espectrometria de massa e degradação de Edman revelou a sequência do N-terminal da thuricina 17 é: DWTCWSCLVVAACSVELL. Esse peptídeo possui uma massa de 3162.3 Da. GRAY *et al.* (2006b) sugerem uma nova classe de bacteriocinas, a classe IId contendo bacteriocinas com o N-terminal conservado (DWTXWSXL). Análises de bioinformática mostram que entre os aminoácidos 8 e 12 (LVVAA) há uma alta hidrofobicidade, o que pode indicar a possível localização de um segmento associado à membrana.

1.2.7.5.9 – Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 e Tolworthcina 524

De um total de 50 estirpes mexicanas de *B. thuringiensis*, BARBOZA-CORONA *et al.* (2007) encontraram somente 5 estirpes com atividades consideráveis: *B. thuringiensis morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis kurstaki* (LBIT 287), *B. thuringiensis kenya* (LBIT 404), *B. thuringiensis entomocidus* (LBIT 420) e *B. thuringiensis tolworthi* (LBIT 524).

Morricina 269 e kurstacina 287 começam a ser produzidas no começo da fase estacionária e atingem seu ápice no fim dessa fase, com 26h de crescimento. Kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 iniciam sua síntese no meio da fase exponencial e atingem seu ápice no começo da fase estacionária, com 15h de crescimento (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007).

As bacteriocinas morricina 269 e kurstacina 287 inibiram *B. cereus* 183, *B. cereus* 001, *B. thuringiensis* (LBIT 52) e *Vibrio cholerae*. Elas não foram efetivas contra *B. subtilis*, *E. faecium*, *S. aureus* e espécies de *Listeria*. Kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 inibiram *B. cereus* 183, *B. cereus* 001, *B. thuringiensis* (LBIT 52), *B. subtilis*, *L. innocua*, *E. faecium* e *V. cholerae*. Todas as bacteriocinas foram efetivas somente contra uma bactéria Gram negativa (*V. cholerae*).

E. coli, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* e *Pseudomonas aeruginosa* não foram inibidas (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007).

Todas perderam atividade quando incubadas com proteinase K, o que indica sua natureza protéica. Nenhuma perda da atividade foi relatada pelo tratamento com RNase, lisozima e α -amilase. O tratamento com tripsina eliminou a atividade de kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524, enquanto morricina 269 e kurstacina 287 não sofreram alteração em sua atividade. Morricina 269 e kurstacina 287 são consideradas termotolerantes por manter atividade até temperaturas de 80° C. Em pH 5.0 mantêm a atividade em 100%. Quando incubados em pH 9.0 perdem 60% da atividade. Kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 são consideradas termoresistentes por manter atividade até temperaturas de 121° C. Quando incubadas em pH 5.0 mantêm 100% da atividade. Apresentam maior resistência a pH extremos. Em pH 11.0 apresentam 80% de atividade residual. A análise da eletroforese em gel mostra que as cinco bacteriocinas apresentam uma massa molecular de, aproximadamente, 10 kDa. O tratamento com β -mercaptoetanol revelou que esses cinco peptídeos não apresentam pontes dissulfeto em sua composição, já que mantiveram atividade após este procedimento (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007).

1.2.7.5.10 – Thuricina S

B. thuringiensis entomocidus HD198 apresenta produção de um composto com forte efeito inibitório. Apresenta inibição contra *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *Enterococcus cloacae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus termophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, espécies de *Salmonella* e *Shigella flexneri*. A presença de atividade no sobrenadante é detectada no meio da fase exponencial (5 h) aumentando na transição entre fase exponencial e estacionária (9 h). A atividade se mantém sem alteração até 40 h de incubação (CHEMINI *et al.*, 2007).

A incubação com proteinase K acaba com a atividade da thuricina S. Porém papaína, tripsina e pepsina não apresentaram efeito. Ela perde completamente sua

atividade quando incubada à 121° C por 10 minutos. Essa bacteriocina é estável em pH's de 3.0 a 10.5 (CHEMINI *et al.*, 2007).

A massa molecular dessa bacteriocina é de 3137.61 Da. A sequência de aminoácidos da thuricina S é DWTXWSXLVXAACSVELL (GenBank: P84763). Thuricina S é similar a algumas bacteriocinas de *B. thuringiensis*. Ela apresenta similaridade com oito aminoácidos da sequência N-terminal da bacthuricina F4 e com 18 aminoácidos da sequência N-terminal da thuricina 17. Apesar de apresentar similaridades em suas sequências, essas bacteriocinas apresentam diferentes massas moleculares e diferentes características (CHEMINI *et al.*, 2007).

1.2.7.5.11 – Thuricina H

Thuricina H é a bacteriocina produzida por *B. thuringiensis* SF361, um isolado retirado de mel (Dakota do Sul, EUA) e que apresenta alta atividade antimicrobiana contra *B. cereus* F4552. Essa bacteriocina é eficaz contra algumas estirpes de *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Carnobacterium piscicola*. *B. thuringiensis* SF361 não apresenta atividade contra bactérias Gram negativas (LEE, H. *et al.*, 2009).

O sequenciamento do N-terminal do peptídeo thuricina H identificou uma sequência com 18 aminoácidos, sendo 14 identificados e quatro não identificados, DWTXWSXLVXAAXSVELL (X representa aminoácidos não identificados). A massa molecular obtida por meio do aparelho nanoESI-qTOF MS desse peptídeo é de 3139.51 Da (LEE, H. *et al.*, 2009).

Técnicas de PCR utilizando quatro oligonucleotídeos mostra a sequência da região que codifica a thuricina H. Três ORFs (*thnA1*, *A2* e *A3*) são arrançadas em sequência e os três genes codificam a mesma bacteriocina, thuricina H. Na região upstream de *thnA1* existe a região -35 e -10 e três sítios de ligação de ribossomos estão localizados 8 pares de bases upstream de códon iniciador de cada cópia da thuricina H. As três ORFs da thuricina H traduzem um prepeptídeo de 40 aminoácidos, METPVVQPRDWTCWSCLVCAACSVELLNLTVAATGASTAS. A massa molecular

calculada e o pI da thuricina H madura é de 3147.61 Da e 3.7, respectivamente (LEE, H. *et al.*, 2009).

A análise através de PCR com a utilização de seis oligonucleotídeos possibilitou o sequenciamento de genes relacionados a bacteriocina thurincina H. Sete ORF's de genes flanqueadores foram determinados: ThnP (homólogo do processador serina protease de peptídeo-sinal de *B. subtilis* ssp. *subtilis* 168); ThnB (homólogo da superfamília radical SAM, uma oxiredutase Fe-S); ThnR (codifica um provável regulador transcricional e dois transportadores ABC); ThnT (proteína de secreção ABC) e ThnI (não apresenta similaridade com gene envolvido na síntese de bacteriocina) (LEE, H. *et al.*, 2009).

1.2.8 - Aplicações industriais

Os consumidores estão cada vez mais preocupados sobre os efeitos adversos de aditivos químicos nos alimentos. Por isso, o consumo de alimentos naturais e orgânicos (sem aditivos químicos) vem aumentando nos últimos anos. Além disso, o crescimento na demanda de alimentos minimamente processados e com longa vida de prateleira tem estimulado a pesquisa em conservantes naturais e eficientes (CHEN e HOOVER, 2003; COTTER *et al.*, 2005; SETTANNI e CORSETTI, 2008).

Apesar da utilização de antibióticos ser proibida em alimentos, a utilização de aditivos antagonistas com propriedades antimicrobianas e conservantes são ferramentas na preservação de alimentos. Em comidas e bebidas, a adição de compostos com função antimicrobiana no processamento dos produtos tem se tornado uma poderosa arma dentro do arsenal existente para a conservação de alimentos (CHEN e HOOVER, 2003). As bacteriocinas são uma atrativa opção para a resolução de parte do problema. Elas são produzidas por organismos de “grau” alimentício (bactérias encontradas comumente em alimentos), geralmente termoestáveis e podem inibir vários organismos patogênicos que podem contaminar alimentos processados. Entretanto, atualmente, somente nisina e pediocina PA1/AcH têm mostrado eficiência em alimentos (COTTER *et al.*, 2005).

A nisina, conhecida desde os anos 20, foi a primeira bacteriocina que se mostrou promissora para o uso na preservação de alimentos, principalmente em produtos

derivados do leite. O uso dessa bacteriocina em escala comercial ocorre há quase 50 anos pela indústria alimentícia (BIZANI, 2004). Seu uso foi aprovado em 47 países (Tabela 3) (MORENO, 1995). No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria nº 6, 1990) para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, na dose máxima de 12,5 mg/kg. Essa mesma dose foi liberada pelo DETEN (Departamento de Técnicas Normativas) do Ministério da Saúde para requeijão (Portaria nº 34/1992) e queijo pasteurizado (Portaria nº 29/1996). Em 1998, a Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério de Agricultura e do Abastecimento, aprovou o uso de nisina em solução de 200 ppm (0,02%) para o emprego em superfícies externas de embutidos, mais especificamente de salsichas do tipo A (ROSA e FRANCO, 2002).

Tabela 3. Utilização da bacteriocina nisina pelo mundo. (adaptado de CLEVELAND *et al.*, 2001; UA– unidade arbitrária)

País	Alimento em que é permitido o uso da nisina	Nível máximo (UA/g)
Argentina	Queijo processado	500
Austrália	Queijo, queijo processado, tomate em conserva	Sem limite
Bélgica	Queijo	100
Chipre	Queijo e vegetais em conserva	Sem limite
Estados Unidos	Queijo processado e pasteurizado	10000
França	Queijo processado	Sem limite
Holanda	Queijo industrial, queijo processado, queijo ralado	800
Itália	Queijo	500
México	Nisina é um aditivo permitido	500
Peru	Nisina é um aditivo permitido	500
Reino Unido	Queijo, alimentos em conserva	Sem limite
Rússia	Queijo diet processado e vegetais em conserva	8000
União Européia	E234 também funciona como preservativo natural	Depende do produto e do país

Existem diversos critérios que devem ser seguidos quando se trata da aplicação de bacteriocinas. O primeiro é que a estirpe produtora deve ser reconhecida como uma estirpe segura (GRAS – “Generally Recognized As Safe”), ou seja, que não oferece perigos aos seres humanos; Segundo, a bacteriocina deve possuir um amplo espectro de inibição que inclua patógenos, ou deve possuir inibição contra algum patógeno particular; Terceiro, a bacteriocina deve ser termoestável; Quarto, não apresentar riscos a saúde; Quinto, a inclusão de bacteriocinas no produto deve melhorar a conservação e qualidade; e Sexto, deve apresentar ação altamente específica (COTTER *et al.*, 2005).

As bacteriocinas podem ser aplicadas em, pelo menos, três formas diferentes: em alimentos fermentados as bacteriocinas podem ser produzidas *in situ*; bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas adicionadas diretamente no produto; ou um produto previamente fermentado com a estirpe produtora da bacteriocina como um ingrediente (CHEN e HOOVER, 2003; COTTER *et al.*, 2005).

A busca por bacteriocinas que sejam eficientes em um determinado tipo de alimento ou contra um alvo específico não deve ser baseada somente na capacidade de possuir um amplo espectro de ação. Outras características como pH ótimo, solubilidade e estabilidade devem ser levados em consideração.

Em produtos à base de carne existe uma grande preocupação com a bactéria *Listeria monocytogenes*, uma bactéria Gram positiva, não formadora de esporos, anaeróbica facultativa e amplamente distribuída no meio ambiente. Ela pode crescer em um gradiente de pH de 4,1 a 9,6 e em temperaturas entre 0 °C e 45 °C. Possui a capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração e condições anaeróbicas, o que a torna um risco para os alimentos (CHEN e HOOVER, 2003). *L. monocytogenes* é a causa de, aproximadamente, 25% das mortes causadas por agentes patológicos associados a alimentos, nos Estados Unidos (MEAD *et al.*, 1999). Ela está relacionada a diversas doenças como meningite, septicemia em adultos, infecção em mulheres grávidas e bebês, pneumonia, endocardite, conjuntivite, uretrite, retardo mental (principalmente em crianças) e psicose em adultos (GRAY e KILLINGER, 1966). Na metade do ano de 2003, o FSIS (Serviço de inspeção e segurança dos alimentos), nos EUA, anunciou a regra de que indústrias de produtos de consumo imediato deveriam tomar conhecimento dos problemas causados pela presença de *L. monocytogenes* em produtos consumíveis. Essa regra estimulou a implementação de tecnologias que podem

matar ou inibir seu crescimento após o cozimento ou o empacotamento (COTTER *et al.*, 2005). A tabela 4 mostra as culturas utilizadas em produtos para evitar o crescimento de *L. monocytogenes*.

Desde que LAB são comumente encontradas em carnes, bacteriocinas dessas bactérias têm sido exploradas e isoladas. Várias bacteriocinas mostraram potencial para a aplicação em alimentos, desde que sejam utilizadas em condições apropriadas. Em carne crua existe uma dificuldade de se aplicar nisina, devido a interferência do alto pH ou de componentes como fosfolipídeos. Já que existe essa dificuldade, outras bacteriocinas têm sido estudadas. As bacteriocinas enterocinas, sakacinas, leucocinas A e carnobacteriocinas A e B (bacteriocinas de *E. faecalis*, *Lactobacillus sake*, *Leuconostoc gelidum* e *Carnobacterium piscicola* respectivamente) promoveram uma maior vida de prateleira para carne fresca (CLEVELAND *et al.*, 2001). SCHILLINGER *et al.* (1991) mostraram que a sakacina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, inibe o crescimento de uma estirpe de *L. monocytogenes* por uma semana em carne picada. *Lactobacillus sake* também conseguiu inibir por alguns dias o crescimento de *L. monocytogenes* em carne crua de porco.

Tabela 4. Uso de culturas protetoras, em produtos à base de carne, para o controle de *Listeria monocytogenes* (adaptado de CHEN e HOOVER, 2003).

Produtos à base de carne	Cultura protetora
Carnes	
Carne picada	<i>Lactobacillus sake</i> Lb 706
Tripa de porco recheada	
Pacotes à vácuo	
Bife em cubo tratado termicamente	<i>Lactobacillus bavaricus</i> MN
Fermentados	
Salsicha seca fermentada	<i>Staphylococcus xylosum</i> DD-34 <i>Pediococcus acidilactici</i> PA-se <i>Lactobacillus bavaricus</i> MI-401 <i>Lactobacillus sake</i> CTC 494 <i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0
Salsicha de frango	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Salame	<i>Lactobacillus plantarum</i> MCS
Salsicha de peru	<i>Pediococcus acidilactici</i> JBL 1095
Pacotes com modificações	
Salsicha brasileira	<i>Lactobacillus sake</i>

Para a utilização de alguma bacteriocina como conservante de alimentos é de extrema importância a busca por informações como espectro de ação, características bioquímicas e genéticas e sua efetividade nos sistemas alimentares (BIZANI, 2004).

2.0 - Justificativa

As bactérias produzem compostos antimicrobianos durante seu crescimento, os quais lhes conferem vantagens ecológicas como a inibição do crescimento de bactérias e outros microrganismos. Esses peptídeos proporcionam uma maior eficácia na invasão de nichos estabelecidos ou na proteção destes. Esses compostos peptídicos estão sendo aplicados com relativa eficiência na indústria alimentícia, principalmente na conservação de produtos à base de leite e carnes. O potencial uso de bacteriocinas de *B. thuringiensis* combinado com sua utilização na agricultura pode ser uma característica a ser explorada em uma ação conjunta e mais completa no âmbito do controle biológico. Sendo assim, o aprofundamento do estudo de bacteriocinas produzidas por *B. thuringiensis* torna-se necessário e importante podendo ser no futuro mais uma alternativa para o controle de doenças microbianas de culturas agrícolas, contaminação de alimentos por agentes patológicos e promotores de crescimento em planta.

2.1 – Hipótese

A estirpe de *B. thuringiensis* S1905 produz compostos com função antimicrobiana capazes de inibir o crescimento de outras estirpes de *Bacillus*.

2.2 Objetivos

2.2.1 - Geral

Identificar a produção de agentes antimicrobianos de *Bacillus thuringiensis*.

2.2.2 – Específicos

Identificar uma estirpe de *B. thuringiensis* que produza agentes antimicrobianos;

Determinar a toxicidade desse agente contra outros microrganismos;

Sequenciar o gene da bacteriocina de *B. thuringiensis* S1905.

3.0 - Material e métodos

3.1 - Materiais

3.1.1 - Químicos e fabricantes

Acetato de Potássio	Vetec
Acetona	Synth
Ácido Acético	Vetec
Ácido cítrico	Sigma
Ácido tricloroacético	Sigma
Acrilamida	Promega
Ágar	Himedia
Agarose	Invitrogen
Azul de Bromofenol	Sigma
Bis – Acrilamida	Promega
Brometo de Etídio	Promega
Butanol	Ecibra
β -mercaptoetanol	Pharmacia
Carbonato de Cálcio	Sigma
Cloreto de Césio	Sigma
Cloreto de Sódio	Sigma
Coomassie blue R 250	Sigma
Dextrose	Getec

dNTP	GE
EDTA	Sigma
Etanol	Quimex
Extrato de levedura	Acumedia
Fosfato de sódio	Sigma
Fosfato de Potássio	Vetec
Glicerol	Sigma
Glicina	Sigma
Glicose	Sigma
Hidróxido de Sódio	Sigma
Persulfato de Amônia	Promega
PMSF	Sigma
Sacarose	Vetec
SDS	Sigma
Sulfato de Magnésio heptahidratado	Vetec
Sulfato de Manganês heptahidratado	Vetec
Sulfato de Zinco heptahidratado	Vetec
TEMED	Pharmacia
Tricina	Sigma
Triptona	BioLab
Tris base	Invitrogen
Tris – HCl	Invitrogen

3.1.2 - Materiais diversos

1 kb plus DNA ladder	Invitrogen
100 bp DNA ladder	Promega
Filtro Millex 0,22 µm	Millipore
Protein Ladder	Promega
Ultra Low Range Molecular Weight Marker	Sigma

3.1.3 - Enzimas

<i>Eco</i> RI	Promega
Proteinase K	Sigma
RNase	Sigma
Taq Polimerase	Pht
Tripsina	Sigma

3.1.4 - Plasmídeo

pGEM T – easy	Promega
---------------	---------

3.1.5 - Meios de cultura

Meio BDA – 200 g/L de Batata, 20 g/L de Dextrose e 20 g/L de Ágar

Meio LB (Luria – Bertani) – 10g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, pH 7.0.

Meio NYSM – 8 g/L de caldo nutriente, 1 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0,1 g/L de CaCO_3 , 0,1 g/L $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0.

3.1.6 - Soluções utilizadas em manipulações protéicas

Corante Coomassie: 0,1% (p/v) Coomassie R250, 40% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético.

Solução descorante: 40% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético.

Tampão de amostra (4x): 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), SDS 4%, β -mercaptoetanol blue 0,2%, glicerol 24%.

Tampão de corrida (1x): 25mM de Tris-base; 0,192 M de glicina; SDS 0,1%.

3.1.7 - Soluções utilizadas em manipulações com DNA

TBE (1 X): 89mM de Tris-base; 89mM de Ácido Bórico; 2mM de EDTA pH 8.0.

Solução corante: 10 $\mu\text{g/ml}$ de Brometo de Etídio

Solução de lise alcalina I : 50mM de glicose, 25mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA (pH 8.0).

Solução de lise alcalina II : 0.2 N de NaOH, 1% (p/v) de SDS

Solução de lise alcalina III: 60 ml de acetato de potássio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial e 28.5 ml de H_2O .

Tampão de amostra: Azul de bromofenol, sacarose, EDTA.

TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0.

3.1.8 - Estirpes de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*

As estirpes de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* utilizados no trabalho pertencem a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As estirpes utilizadas foram: *B. cereus* S1181, S1183; *B. thuringiensis* S18, S39, S62, S75, S89, S93, S109, S130, S135, S141, S159, S202, S222, S253, S597, S599, S601, S608, S612, S616, S617, S655, S700, S958, S1122, S1156, S1167, S1168, S1170, S1180, S1184, S1185, S1206, S1261, S1265, S1268, S1270, S1271, S1296, S1301, S1357, S1365, S1450, S1806, S1905, S1989, S2193, S2195; *B. sphaericus* S2362, S242.

3.1.9 - Estirpes de outras bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas e fungos

Todas as bactérias ATCC's ("America Type Culture Collection") utilizadas no trabalho foram cedidas gentilmente do banco de bactérias do laboratório Exame. As espécies de bactérias utilizadas foram: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213.

As bactérias *E. coli* DH5 α , *E. coli* XL 1 blue e *E. coli* Top 10 foram obtidas das companhias Sigma, Agilent e Invitrogen, respectivamente.

As quatro espécies de fungos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotium* e *Sclerotium rofsii* foram cedidas gentilmente pelo laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.2 - Avaliação da produção de compostos antimicrobianos por estirpes de *Bacillus*

Dois modelos de experimento foram utilizados. No primeiro sete estirpes de *Bacillus thuringiensis* (S1122, S1450, S1806, S1905, S1989, S2193 e S2195) e duas estirpes de *Bacillus sphaericus* (S2362 e S242) foram crescidas em incubadoras rotativas (200 rpm) em erlenmeyers de 50 mL na razão 1% (v/v), contendo 15 mL de meio NYSM (YOUSTEN, 1984) a 28° C por 72 h. Amostras foram coletadas e centrifugadas a 14000 xg por 10 min a 4° C (Jouan BR4i, EUA). Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em filtro Millex (Millipore, EUA) de 0,22 µm. Em seguida, discos de papel filtro (Whatmann nº 1) de 1 cm de diâmetro foram embebidos no sobrenadante produzido pelas estirpes e colocados sobre a superfície de NYSM sólido, previamente distribuído em Placa de Petri, contendo 200 µL da bactéria teste (KIMURA *et al.*, 1998) (Figura 7) . Essas placas de Petri contendo as triplicatas foram mantidas a 28°C por 72 h, sendo avaliada a formação de halos em intervalos de 24 h. Todos os sobrenadantes foram testados contra todas as estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*.

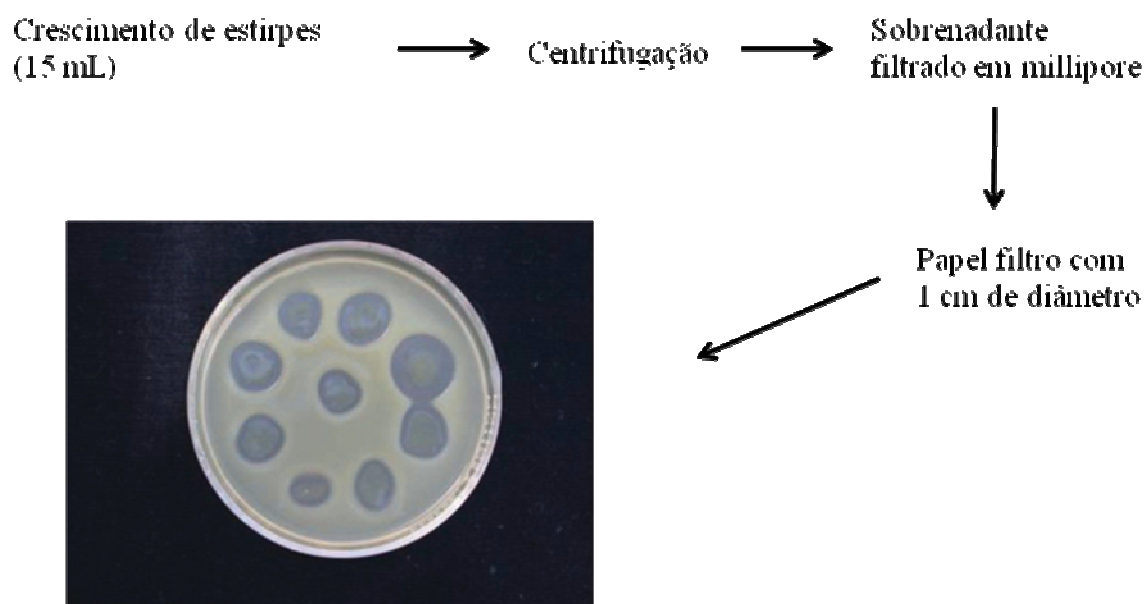


Figura 7. Modelo esquemático do experimento 1 de avaliação de compostos antimicrobianos por estirpes de *Bacillus*.

No segundo experimento, as estirpes testadas para a produção de compostos antimicrobianos foram incubadas em 5 mL de meio NYSM a 28° C durante 16 h e as as

bactérias-alvo foram crescidas durante 72 h. As bactérias testes foram inoculadas em placas de Petri com meio NYSM sólido. Discos de papel autoclavado com 0,5 cm de diâmetro foram colocados sobre as culturas das bactérias testes e posteriormente colocados sobre placas com meio NYSM sólido contendo 1% de bactéria alvo (Figura 8). As placas contendo as triplicatas foram mantidas a 28 ° C por 72 h, sendo avaliada a formação de halos em intervalos de 24 h.

Essas estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* foram escolhidas por serem utilizadas como padrão para Dipteros, Lepidopteros e Coleopteros.

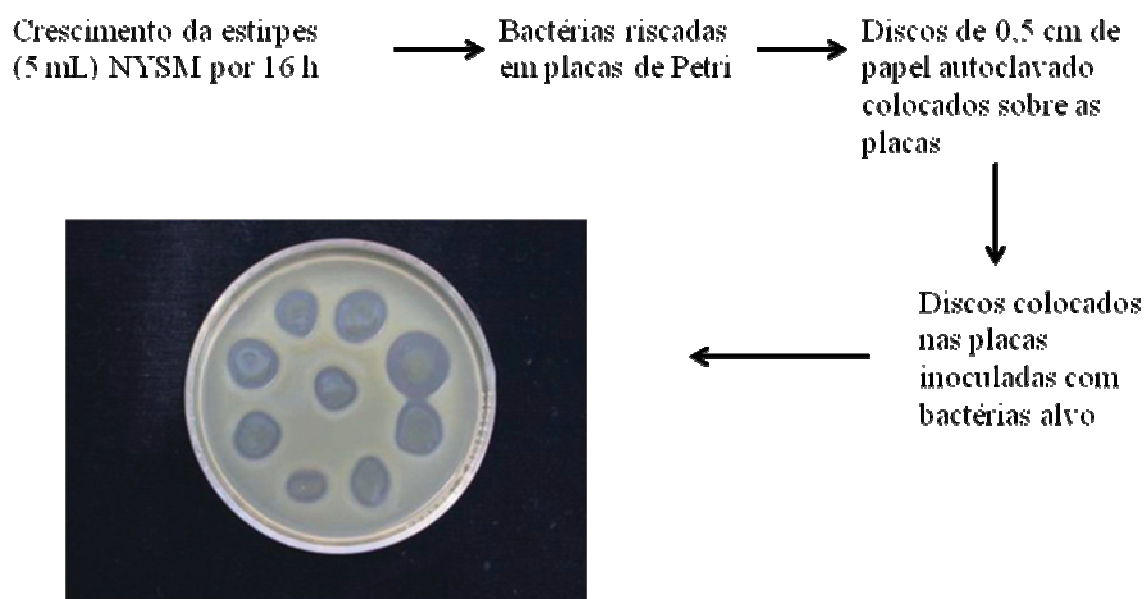


Figura 8. Modelo esquemático do experimento 2 de avaliação de produção de compostos antimicrobianos por estirpes de *Bacillus*.

3.3 - Cinética de crescimento bacteriano

A estirpe S1905 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, obtida da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foi crescida em 600 mL de meio LB (Luria Broth) em erlenmeyer de 2 L durante 72 h, com agitação de 400 rpm a 28° C (3235 incubator shaker, LAB-Line, EUA). Para fazer o pré-inóculo, tiras de papel filtro com esporos da estirpe S1905 foram incubadas em meio NYSM por 16h para a inoculação do meio na razão de 1% (v/v). A cada intervalo de duas horas, amostras eram coletadas do meio de cultura, o crescimento celular

acompanhado pela observação da densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro (HITACHI – U 200, Japão) e microscópio de luz, e o pH do meio acompanhado pelo uso de tiras (Macherey-Nagel, Alemanha) até 72 h após a inoculação do meio. As amostras foram analisadas em triplicata.

As amostras coletadas foram centrifugadas a uma velocidade de 15000 rpm a 4° C por 15 min (Jouan BR4i de Rotor de ângulo fixo, EUA). Os sobrenadantes foram separados do pellet e posteriormente filtrados em filtros Millex de 0,22 µm. Os sobrenadantes de todos os intervalos de tempo coletados foram armazenados a - 20° C para análises posteriores.

3.4 - Quantificação e perfil de proteínas

As proteínas contidas no sobrenadante (proteínas solúveis) foram quantificadas com o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) seguindo as instruções do fabricante (BioRad). O perfil protéico, massa molecular e integridade das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% (Mini VE Hofer, GE) LAEMMLI (1970) e comparados com o marcador “protein ladder” (Promega). Os géis foram corados e fixados em solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético e Azul de Coomassie 0,1% por cerca de 16 h, sob leve agitação. Para descorar os géis foi utilizado uma solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético por 3 h, sob leve agitação. Os géis de sobrenadante, quando necessários, foram corados com prata, de acordo com BLUM *et al.* (1987).

3.5 - Detecção da atividade antimicrobiana

O teste utilizado para a detecção de atividade antimicrobiana foi o “well diffusion method” de JACK *et al.* (1995). O teste foi adaptado e realizado contra a estirpe S2195 de *B. thuringiensis*. As placas de Petri foram compostas por duas camadas de NYSM ágar de 15 mL cada. A primeira com concentração de 2,0% e a segunda com 0,7%. Após a formação da primeira camada mais concentrada três ponteiros de 1000 µL foram colocadas de “cabeça para baixo” umas distantes das outras para a formação de três poços com 9 mm de diâmetro cada. A segunda camada foi inoculada com a bactéria alvo (S2195) na razão 1% (v/v) em um tubo falcon de 50 mL e posteriormente

plaqueada sobre a primeira camada de NYSM ágar. Os poços foram preenchidos com 80 µL de sobrenadante filtrado de S1905. As placas foram incubadas a 30° C por 24 h antes dos halos de inibição serem medidos em milímetros. Os halos foram avaliados estatisticamente pelo programa SigmaStat usando a análise de ANOVA. A menor zona de inibição detectável nas placas foi de 1 mm. Assim foi definido que uma unidade de atividade é igual a 1 mm² de zona de inibição da bactéria alvo (DELGADO *et al.*, 2005).

Sabendo o pico de atividade do sobrenadante de *B. thuringiensis* S1905, este foi testado contra vários microorganismos diferentes (Tabela 5). Os meios utilizados para o crescimento de bactérias foram NYSM e LB. Todas as bactérias foram testadas pelo método do “well diffusion method” O meio utilizado para o crescimento de fungos foi o BDA. O método utilizado para testar a sensibilidade dos fungos fitopatogênicos foi o “agar disk diffusion assay” (KIMURA *et al.*, 1998), no qual discos de papel autoclavado, embebidos com sobrenadante da estirpe S1905 de *B. thuringiensis*, são colocados sobre culturas de fungo.

Tabela 5. Espécies de bactérias e fungos testados para a determinação do espectro antimicrobiano.

Estirpes testadas	Incubação	
	Meio de cultura	Temperatura (° C)
Gram positivas		
<i>Bacillus thuringiensis aizawai</i> S616	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis aizawai</i> S1357	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis alesti</i> S655	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis alesti</i> S1268	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis alesti</i> S1296	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis argentiniensis</i> S1168	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis canadiensis</i> S1271	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i> S612	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i> S1167	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i> S1184	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i> S1156	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i> S1185	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i> S1270	NYSM ¹	28

Estirpes testadas	Incubação	
	Meio de cultura	Temperatura (° C)
<i>Bacillus thuringiensis fukuokaensis</i> S608	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i> S597	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i> S958	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i> S1206	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis indiana</i> S18	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S89	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S159	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S222	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S1806	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S1989	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i> S109	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i> S599	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i> S617	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kumatokoensis</i> S1457	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S49	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S93	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S1450	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S1905	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S2193	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S2195	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis morrisoni</i> S180	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis morrisoni</i> S1265	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis morrisoni</i> S1301	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis muju</i> S1170	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis muju</i> S1180	NYSM ¹¹	28
<i>Bacillus thuringiensis ostrinae</i> S700	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis ostrinae</i> S1261	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis pakistani</i> S1365	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis sotto</i> S615	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis sotto</i> S1165	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis sotto</i> S1192	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i> S1122	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis thuringiensis</i> S39	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis thuringiensis</i> S601	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis tochigiensis</i> S202	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis tochigiensis</i> S253	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis tohokuensis</i> S141	NYSM ¹	28

Estirpes testadas	Incubação	
	Meio de cultura	Temperatura (° C)
<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i> S62	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i> S75	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i> S135	NYSM ¹	28
<i>Bacillus thuringiensis xianguongies</i> S1178	NYSM ¹	28
<i>Bacillus cereus</i> S1181	NYSM ¹	28
<i>Bacillus cereus</i> S1183	NYSM ¹	28
<i>Bacillus sphaericus</i> S242	NYSM ¹	28
<i>Bacillus sphaericus</i> S2362	NYSM ¹	28
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	LB ²	30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	LB ²	30
Gram negativas		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	LB ²	30
<i>Escherichia coli</i> DH5α	LB ¹	30
<i>Escherichia coli</i> XL 1 blue	LB ¹	30
<i>Escherichia coli</i> Top 10	LB ¹	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LB ²	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	LB ²	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	LB ²	30
Fungos		
<i>Fusarium solani</i>	BDA ³	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	BDA ³	25
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	BDA ³	25
<i>Sclerotium rolfsii</i>	BDA ³	25

(1) Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; (2) Laboratório EXAME; (3) Laboratório de Fungos Fitopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.6 - Efeito de enzimas proteolíticas, pH, temperatura e liofilização sobre o efeito antimicrobiano.

Enzimas proteolíticas foram testadas em sobrenadante filtrado da estirpe S1905 de *B. thuringiensis*. Amostras de 1 mL foram tratadas a 37° C por 1 h na concentração final de 2 mg/mL com as enzimas proteinase K (Sigma) e tripsina (Sigma). Para inativação das enzimas foi adicionado PMSF 5 mM e inibidor de tripsina para proteinase K e tripsina respectivamente. Água destilada, água destilada com enzima e

sobrenadante sem enzima foram usados como controles. O efeito de vários solventes orgânicos foi avaliado após a incubação do sobrenadante por 1 h a 25° C com 10% (v/v) de acetona, butanol, etanol e metanol.

Para o teste de termoestabilidade, amostras de sobrenadante filtrado da estirpe S1905 de *B. thuringiensis* foram incubadas em diversas temperaturas: -80° C por 30 dias, - 20° C por 30 dias, 4° C por 30 dias, 30° C a 90° C por 30 min e 120° C por 15 min. Com o resultado foi possível calcular a Atividade Residual (A.R.) do sobrenadante após a incubação em diferentes temperaturas, pela utilização da fórmula:

$$\text{A.R. (\%)} = \frac{\text{Ht} - 9}{\text{Hc} - 9} \times 100$$

A.R.: Atividade Residual; Ht: Halo após tratamento; Hc: halo controle e 9: tamanho do poço (cm).

A atividade do composto antimicrobiano foi testada em diferentes pH's. Soluções tampão com pH entre 2 e 10 foram feitas para o teste (Tabela 6). O sobrenadante (200 µL) foi incubado com 200 µL da solução tampão por 2 h a 35° C. Para fazer as soluções específicas para cada pH, as substâncias foram calculadas e dissolvidas em água deionizada e seus pHs ajustados para o valor específico com HCl ou NaOH. Água destilada, água destilada com solução tampão e sobrenadante filtrado de S1905 foram usados como controle.

Tabela 6. Soluções tampão para o teste em pH.

pH da solução	Solução tampão	Molaridade (mM)
2.0 e 3.0	Glicina	10
4.0 e 5.0	Citrato	10
6.0,7.0 e 8.0	Fosfato	10
9.0 e 10.0	Tris	10

O sobrenadante filtrado de S1905 também foi testado contra condições de liofilização (Christ Alpha 2-4 LD plus, EUA). O material liofilizado foi testado pelo

método “well diffusion method” em variadas concentrações contra a estirpe S2195 de *B. thuringiensis*. Esse material foi avaliado nas concentrações de 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg e 25 mg ressuspensos em 1 mL de água deionizada (“millique) estéril. Antes de serem aplicadas nas placas, as soluções foram filtradas em filtro millex (Millipore) de 0,22 µm.

3.7 - Clonagem e sequenciamento do gene da bacteriocina

Para a extração de DNA total e plasmidial, a bactéria S1905 foi crescida durante 16 h em meio NYSM. A extração do DNA total foi feita de acordo com SAMBROOK e RUSSEL (2001) com algumas modificações: (1) Um volume de 3 mL de cultura foi centrifugado a 200 rpm por 5 min a 4° C (Jouan BR4i de rotor de ângulo fixo, EUA). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 200 µL de água deionizada; (2) A solução foi congelada por 1 h a - 20° C e posteriormente, fervida a 100° C por 10 min; (3) Nessa solução, foram adicionados 100 µL de solução gelada de lise alcalina I, seguido de homogeneização através do vortéx (Fisher Vortez G560E, EUA); (4) Duzentos µL de solução de lise alcalina II foram adicionados. O tubo de eppendorf foi fechado e o conteúdo da solução misturado invertendo o tubo cinco vezes; (5) Cento e cinquenta µL de solução de lise alcalina III foram adicionados e a amostra invertida sete vezes para a dispersão da solução. A amostra foi colocada no gelo por 3 – 5 min; (6) a amostra foi centrifugada a 12000 xg a 4° C por 5 min e o sobrenadante transferido para um eppendorf novo e estéril; (7) os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 2 volumes de etanol absoluto ao sobrenadante a temperatura ambiente. A solução foi homogeneizada através do vortéx e mantida a temperatura ambiente por 2 min; (8) os ácidos nucleicos precipitados foram coletados pela centrifugação da solução a 12000 rpm (Jouan BR4i de rotor de ângulo fixo) por 5 min a 4° C; (9) o sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado de forma invertida para a retirada do sobrenadante restante; (10) etanol 70% foi adicionado ao pellet e a solução centrifugada a 12000 xg por 2 min a 4° C; (11) o sobrenadante foi retirado totalmente do tubo e (12) o pellet foi ressuspensionado em 50 µL de TE (Tampão Tris10mM – EDTA 1mM em pH 8.0) contendo 20 µg/mL de Dnase free – free Rnase A. A solução foi homogeneizada e armazenada a - 20° C. A extração de DNA plasmidial foi realizada de acordo com SAMBROOK e RUSSEL (2001).

A região gênica que contém o gene da bacteriocina da estirpe S1905 de *B. thuringiensis* foi, primeiramente, amplificada por PCR (Polymerase Chain Reaction), usando os oligonucleotídeos (Tabela 7) obtidos de LEE, K.D. *et al.* (2009). Os oligonucleotídeos NEB-F2 e NEB-R foram desenhados a partir dos códon de preferência para *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis* para a detecção das regiões “downstream” e “upstream” do gene que codifica a thurcina 17. A análise da região downstream do gene da thurcina 17 revelou uma homologia com o gene *alba* de *B. subtilis*, que codifica uma bacteriocina de 448 aminoácidos e, assim, essa região de homologia foi utilizada para desenhar o primer reverso NEB17albAup. Os problemas de ambiguidade na sequência foram solucionados a partir de outro primer, thur17dn. O programa de PCR utilizado para a amplificação foi de desnaturação inicial a 94° C/5 minutos, 30 ciclos de 94° C/ 1 min, 53° C/1 min e 72° C/1 min com extensão final de 72° C/5 minutos. O PCR foi realizado em termociclador (Techne TC412HD2D, UK). A reação de PCR foi composta de 100 ng de DNA + 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen, EUA) + 2,5 U de Taq Polimerase (pht, Brasil) + 0,2 mM de dNTP (GE, EUA) + tampão 1X em 25 µL de reação. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados em solução com brometo de etídeo e descorados. Os fragmentos mais amplificados foram eluídos do gel, utilizando-se o kit ilustra DNA and gel band purification (GE, UK) seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela 7. Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen (EUA).

Oligonucleotídeo	Sequência	Utilidade	Temperatura de anelamento (° C)
NEB – F2	5'GTATGTGCAGCATGTTCTGTAG3'	PCR	53
NEB – R	5'AACAAGACCAACATGTCC3'	PCR	53
NEB 17albAup	5'GTGGCGGTTTTATTTATCG3'	PCR	53
Thur17dn	5'TAAAACATAGGGAGTTATACTTAG3'	PCR	53
Universal	5'GTAAAACGACGGCCAGT3'	Sequenciamento	-
Reverso	5'GGAAACAGCTATGACCATG3'	Sequenciamento	-

O fragmento amplificado foi, inicialmente, clonado no vetor pGEM-T easy® (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e amplificado em *E. coli* DH5α (Invitrogen) de acordo com SAMBROOK e RUSSEL (2001). Os clones positivos foram confirmados por análise de PCR, usando-se os oligonucleotídeos e o programa descritos anteriormente. O sequenciamento dos clones positivos foi realizado pela Macrogen (Coréia). O sequenciamento foi realizado nas duas fitas de DNA utilizando os oligonucleotídeos Universal e Reverso (Tabela 8) de acordo com os protocolos utilizados pela empresa. As sequências foram avaliadas e alinhadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor. Essas sequências foram submetidas à análise por BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e pelo “ORF (Open Reading Frame) Finder” (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf). A proteína obtida pelo ORF FINDER foi submetido a análise no BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Os clones positivos foram digeridos com enzima de restrição *EcoRI*, segundo as instruções do fabricante (Promega, EUA). O resultado da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

3.8 - Análises *in silico*, modelagem e SDS-PAGE de bacteriocina

O peptídeo maduro da bacteriocina thuricina S1905 foi analisado por meio de softwares de bioinformática. O software ProtParam, localizado no sítio (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>), computa várias propriedades físico-químicas que podem ser deduzidas a partir da sequência protéica. Esse software pode deduzir o peso molecular, pI teórico e a composição de aminoácidos.

O peptídeo também foi analisado no Peptide Cutter (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>), que pode deduzir potenciais sítios de clivagem, através de químicos ou proteases, da proteína estudada. Esse programa utiliza as seguintes substâncias: Arg-C proteinase, Asp-N endopeptidase, Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu, BNPS-skatole, caspases (1-10), quimotripsina de alta e baixa afinidade, clostripaína, CNBr (Brometo de cianogênio), enteroquinase, granzima B, fator Xa, ácido fórmico, endopeptidase glutamyl, hidroxilamina, ácido isodobenzóico, endoproteinase Lys C, endoproteinase Lys N, ácido 2-nitro-5-tiocianobenzóico, pepsina, endopeptidase de prolina, proteinase K, peptidase de *Staphylococcal*, protease do vírus do tabaco, termolisina, trombina e tripsina.

Na dedução de regiões hidrofóbicas foram utilizados os softwares TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) e ProtScale (www.expasy.ch/tools/protscale.html). O TMHMM (“TransMembrane prediction using Hidden Markov Models”) é um programa utilizado para a predição de hélices transmembrânicas baseado no modelo de Markov. No ProtScale utilizamos o método de Kyte & Doolittle (1982) e a janela selecionada para a visualização foi a de tamanho 7. Nessa janela é possível visualizar regiões hidrofóbicas e hidrofílicas.

O alinhamento das bacteriocinas de *B. thuringiensis* foram conduzidas pelo software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Esse software permite o alinhamento de múltiplas sequências e mostra as similaridades, identidades e diferenças entre elas.

A predição de estrutura de proteínas através de uma sequência de aminoácidos tem sido um dos problemas mais desafiadores da biologia computacional nos últimos anos (BAKER; SALI, 2001). Historicamente, a predição de estrutura de proteínas é dividido em três categorias: modelagem comparativa, “threading” e *ab initio*. As duas primeiras constrói modelos pelo alinhamento de sequências em “templates” de estruturas conhecidas (WU *et al.*, 2007). Quando esses “templates” são identificados, modelos com alta-resolução podem ser obtidos através dessa metodologia. Se os templates não existirem nos arquivos do PDB (“Protein Data Bank”), os modelos devem ser construídos do início, ou seja, por modelagem *ab initio*. Essa é a categoria mais difícil entre as predições de estruturas protéicas (WU *et al.*, 2007).

Como não existe nenhum peptídeo com similaridade significativa com as bacteriocinas de *B. thuringiensis* a modelagem por *ab initio* foi escolhida. A modelagem da thuricina S1905 foi primeiramente submetido no software I-TASSER (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>) (ZHANG, 2007; 2008; WU, 2007). O I-TASSER prediz os modelos com conformações possíveis e calcula qual deles é o mais provável. Para essa análise utilizou-se “C-score”, que estima a qualidade dos modelos preditos. O valor desse índice varia, geralmente, entre -5 e 2, sendo o modelo com valor mais alto é o mais confiável. A validação do modelo foi realizada no software PROCHECK (<http://www1.jcsg.org/tmp/prod/validation/6865/procheck/procheck.html>). A superfície eletrostática foi predita pelo software Swiss-Prot PDB Viewer (SPDBV) e nele foram

destacados os aminoácidos mais importantes, no qual a cor vermelha representa carga negativa, azul representa carga positiva e branco, carga neutra.

O gel de SDS-PAGE (BioRad Mini Protean Tetra Cell) de tris-tricina foi utilizado para a detecção de proteínas de baixa massa molecular (SCHAGGER e JAGOW, 1987) Após a eletroforese, o gel foi fixado durante 16 h em solução de 25% de propanol e 10% de ácido acético, corado com Coomassie Blue e, posteriormente, descorado em solução descorante. Poucas bandas foram visualizadas e, assim, o gel foi corado com prata de acordo com BLUM *et al.* (1987). O marcador utilizado no gel foi o Ultra Low Range Molecular Weight Marker (M.W. 1,06-26,6) (Sigma).

4.0 - Resultados e Discussão

4.1 – Avaliação da produção de compostos antimicrobianos por estirpes de *Bacillus*

No experimento onde discos de papel autoclavados foram embebidos com o sobrenadante filtrado das culturas, S1905 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) foi a mais efetiva em inibir estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*. Esta estirpe inibiu somente estirpes de *B. thuringiensis* e apresentou uma maior inibição durante as primeiras 24 h após o plaqueamento. As estirpes inibidas por S1905 nas primeiras 24 horas foram S1450, S1806, S1989, S2193 e S2195 (Tabela 8). Após 48 h de plaqueamento o número de estirpes inibidas diminuiu e somente as estirpes S1450, S1806, S2193 e S2195 continuaram com inibição considerável. Com 72 h de plaqueamento o número continuou diminuindo e somente duas estirpes apresentaram inibição pela estirpe S1905: S1450 e S2195. Algumas outras estirpes também apresentaram a produção de algum composto antimicrobiano: S242, S1450, S1989, S2193 e S2362.

Tabela 8. Análise do efeito inibitório do sobrenadante de cultura das estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*. Na 1ª coluna estão as bactérias alvo e nas linhas o sobrenadante das bactérias testes (+ inibição; - sem inibição). Bactérias : S242 (*B. sphaericus*); S1122 (*B. thuringiensis tenebrionis*); S1450 (*B. thuringiensis kurstaki*); S1806 (*B. thuringiensis israelensis*); S1905 (*B. thuringiensis kurstaki*); S1989 (*B. thuringiensis israelensis*); S2193 (*B. thuringiensis* like); S2195 (*B. thuringiensis kurstaki* like) e S2363 (*B. sphaericus*).

24 h									
	242	1122	1450	1806	1905	1989	2193	2195	2362
242	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1122	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1450	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1806	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1905	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1989	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2193	-	-	+	-	+	-	-	-	-
2195	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2362	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 h									
	242	1122	1450	1806	1905	1989	2193	2195	2362
242	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1122	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1450	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1806	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1905	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1989	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2193	-	-	+	-	+	-	-	-	-
2195	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2362	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 h									
	242	1122	1450	1806	1905	1989	2193	2195	2362
242	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1122	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1450	+	-	-	-	+	-	-	-	-
1806	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1905	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1989	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2193	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2195	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2362	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No segundo experimento para a detecção de estirpes produtoras de compostos antimicrobianos a estirpe S1905 também se mostrou eficaz para a inibição de outras estirpes de *B. thuringiensis*. Após 72 h do plaqueamento, sete das nove estirpes testadas foram inibidas por S1905: S242, S1122, S1450, S1806, S1989, S2193, S2195. Em todos os intervalos de 24 h de leituras das placas houve inibição de seis estirpes,

sendo que S242, S1122, S1450, S1989 e S2193 foram inibidas em todos os intervalos de tempo. Outra estirpe que produziu algum composto antimicrobiano foi a estirpe S2195 causando inibição na estirpe S2193 (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de presença de atividade nas estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*. A 1ª coluna representa as estirpes alvo e as linhas, as estirpes produtoras (+ inibição; - sem inibição). Bactérias : S242 (*B. sphaericus*); S1122 (*B. thuringiensis tenebrionis*); S1450 (*B. thuringiensis kurstaki*); S1806 (*B. thuringiensis israelensis*); S1905 (*B. thuringiensis kurstaki*); S1989 (*B. thuringiensis israelensis*); S2193 (*B. thuringiensis* like); S2195 (*B. thuringiensis kurstaki* like) e S2363 (*B. sphaericus*)

		24 h								
	242	1122	1450	1806	1905	1989	2193	2195	2362	
242	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
1122	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
1450	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
1806	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
1905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1989	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
2193	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
2195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		48 h								
242	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
1122	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
1450	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
1806	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1989	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
2193	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
2195	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
2362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		72 h								
242	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
1122	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
1450	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
1806	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1905	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1989	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
2193	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
2195	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
2362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

4.2 - Cinética de crescimento bacteriano

A estirpe S1905 foi incubada em meio LB a 28° C em shaker por 48 h. O pH do meio de cultura antes da inoculação foi igual a 7.0. Através do microscópio óptico foi observado poucas células vegetativas com 4 h de crescimento. Nesse momento o pH se manteve em 7.0. A partir das 6 h, as células vegetativas entraram em processo de divisão acelerado aumentando o número de células do meio de cultura. O pH, com 6 h de crescimento, caiu para 6.0. Pelo acompanhamento da densidade óptica, nota-se que nesse período se inicia a fase exponencial ou log de crescimento bacteriano. O pH 6.0 se manteve até 8 h após inoculação do meio. Com 10 h, o pH do meio foi para 5.0. A fase estacionária se inicia com aproximadamente 16 h de crescimento. Nessa fase, o pH do meio voltou a subir para o valor de 7.0. Os esporângios apareceram com 26 h de crescimento. Nesse momento, o pH do meio foi de 8.0. A formação de esporos aumenta com o passar das horas e com 40 h, praticamente todas as células apresentaram esporos formados. Com, aproximadamente, 42 h de crescimento, se iniciou a liberação dos esporos. O pH do meio se manteve igual a 8.0 até o fim do crescimento da bactéria (Figura 9).

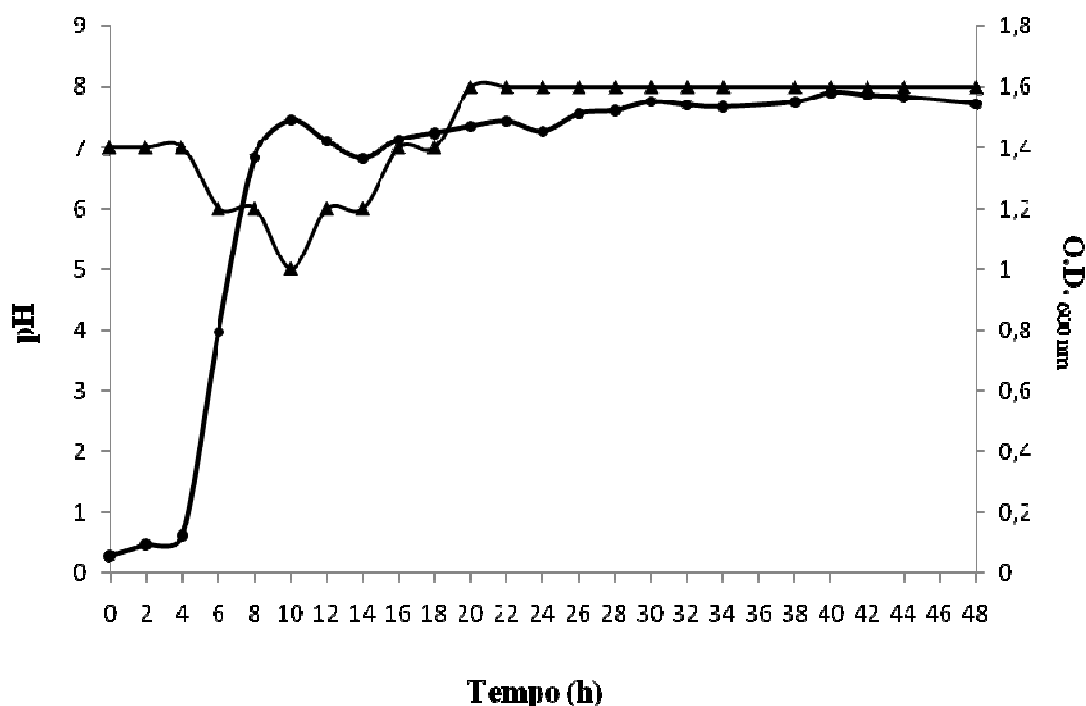


Figura 9. Cinética de crescimento da bactéria *B. thuringiensis* S1905 e pH do meio ao longo do crescimento: (●) O.D. 600 nm; (▲) pH.

4.3 - Quantificação de proteínas do sobrenadante

A quantificação de proteínas do sobrenadante mostra que as maiores concentrações de proteínas não coincidiram com os picos de halos de inibição. Ela subiu exponencialmente com quatro horas e depois apresentou poucas variações com um pico em 40 h de crescimento (Figura 10).

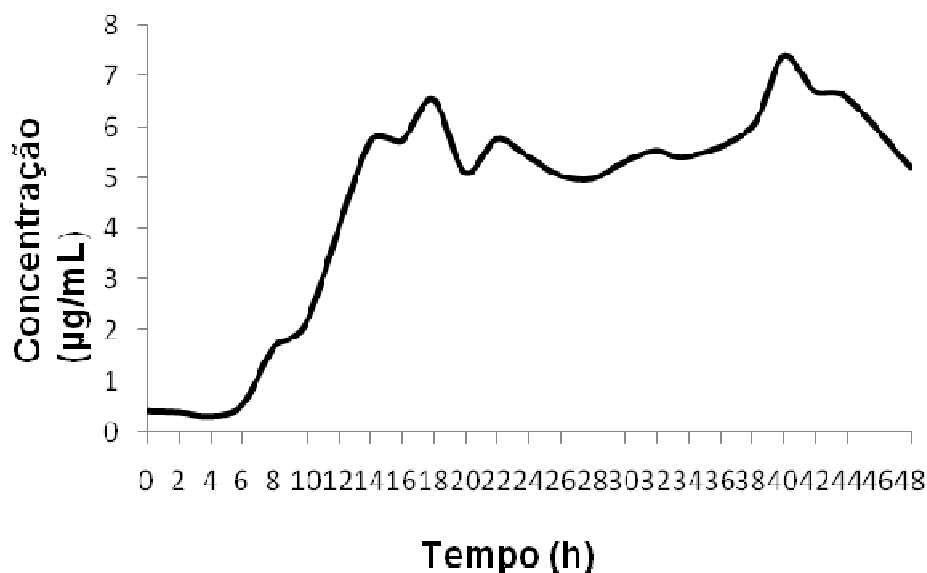


Figura 10. Quantificação de proteínas secretadas durante o crescimento de células de *B. thuringiensis* S1905.

O perfil protéico do sobrenadante filtrado da estirpe S1905 está representado na figura 11.

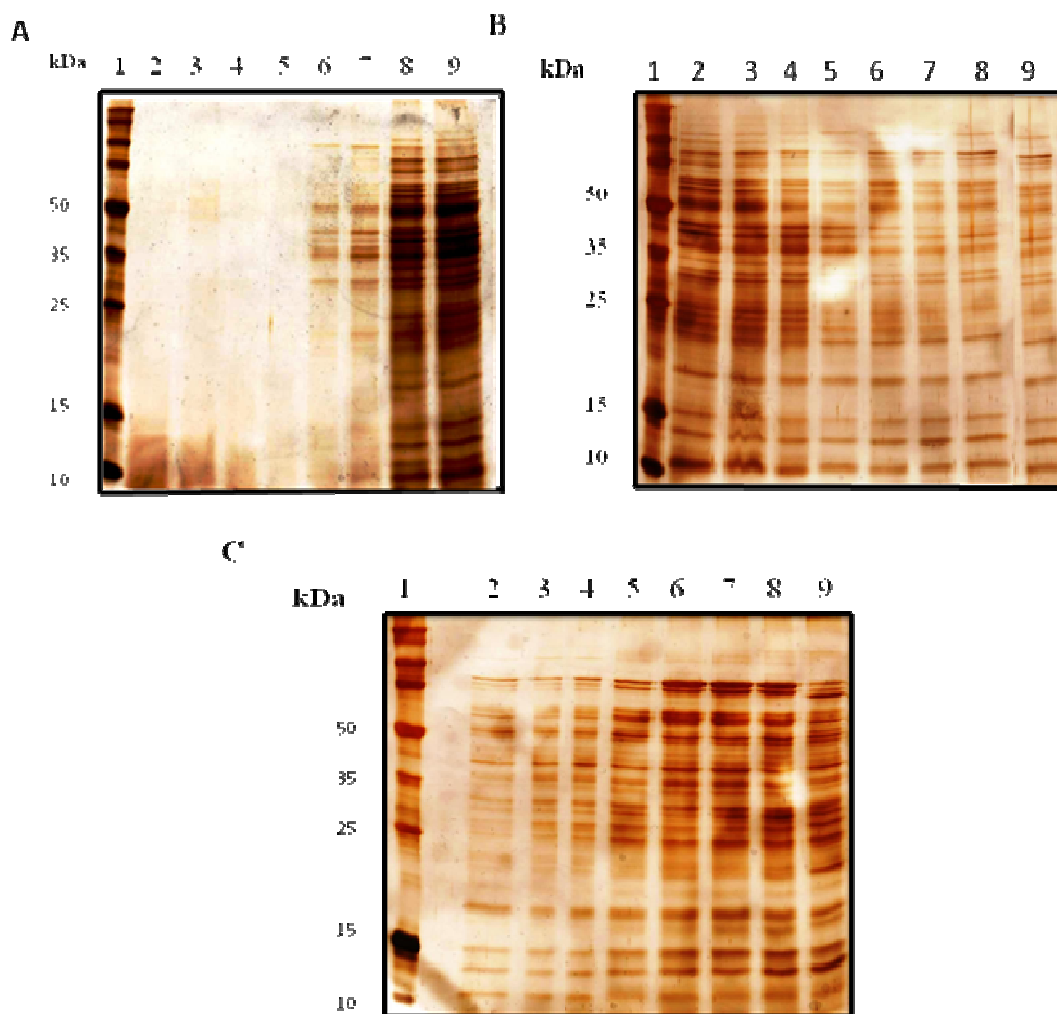


Figura 11. Perfil protéico do sobrenadante filtrado de *B. thuringiensis* S1905. A) 1 - Marcador protein ladder (Promega), 2 – 2 h; 3 – 4 h; 4 – 6 h; 5 – 8 h; 6 – 10 h; 7 – 12 h; 8 – 14 h; e 9 – 16 h. B) 1 - Marcador protein ladder (Promega); 2 – 18 h; 3 – 20 h; 4 – 22 h; 5 – 24 h; 6 – 26 h; 7 – 28 h; 8 – 30 h; e 9 – 32 h. C) 1 - Marcador protein ladder (Promega); 2 – 34 h; 3 – 36 h; 4 – 38 h; 5 – 40 h; 6 – 42 h; 7 – 44 h; 8 – 46 h; e 9 – 48 h.

Até oito horas de crescimento não foi detectada produção de proteínas de baixa massa molecular. A partir das 10 h notou-se a produção de proteínas na faixa de 50 kDa e na fase estacionária apareceram as primeiras proteínas com baixa massa molecular (~10kDa). Depois das 14 h formou-se um padrão protéico com várias proteínas variando entre 110 e 10 kDa.

4.4 - Detecção de produção de agentes antimicrobianos das culturas de *B. thuringiensis* S1905

Os sobrenadantes foram extraídos e testados contra S2195 e um gráfico de inibição foi gerado (Figura 12).

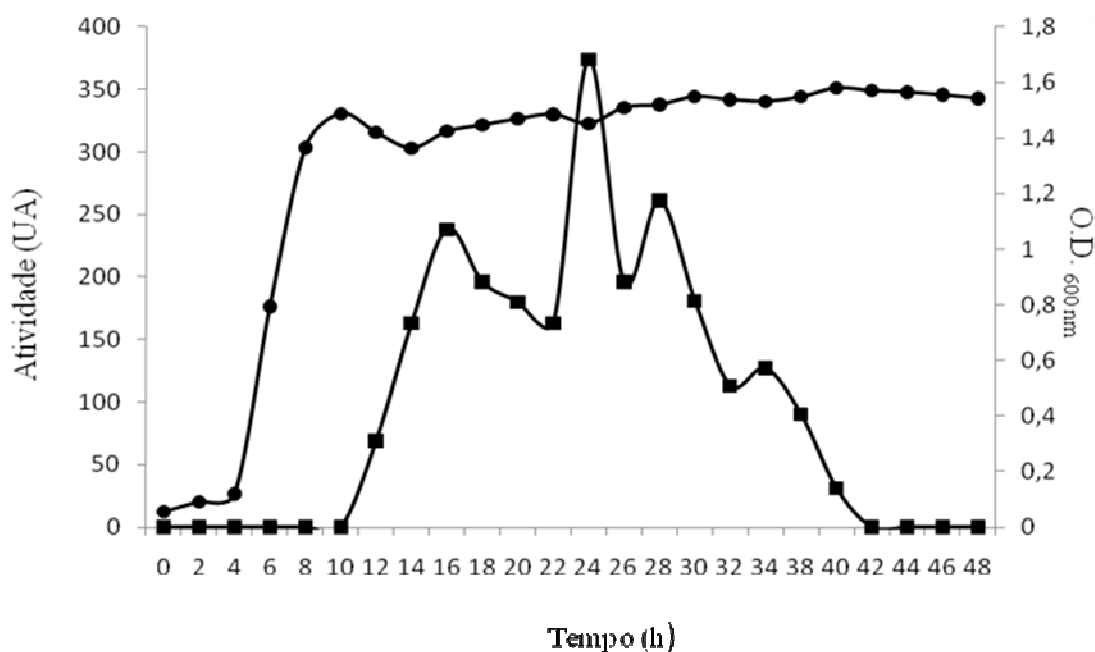


Figura 12. Produção do composto antimicrobiano por *B. thuringiensis* S1905 cultivado em meio LB líquido. (■) atividade do composto antimicrobiano expresso em UA (Unidade Arbitrária) e testado através do método de “well diffusion”; (●) crescimento da estirpe S1905 acompanhado por espectrofotômetro em O.D. de 600 nm.

A produção do composto antimicrobiano foi detectada no fim da fase exponencial, com 12 h de crescimento. O pico de atividade ocorre no meio da fase estacionária, com aproximadamente 24 h de crescimento. A atividade do composto diminui bastante até 40 h de crescimento. Com 42 h o composto já não apresenta mais atividade antimicrobiana. Isso pode acontecer devido à esporulação, que tem seu início nesse período de 40 h, aproximadamente. É possível que a queda na atividade esteja associada com a esporulação, pois esse comportamento também foi observado na cereína (bacteriocina produzida por *B. cereus* GN105) e na tochicina (bacteriocina de *B. thuringiensis tochigiensis*) (NACLERIO *et al.*, 1993; PAIK *et al.*, 1997).

Essas características são corroboradas por outras bacteriocinas de *B. thuringiensis*. A produção de thuricina 7 é detectada no fim da fase exponencial e seu pico de atividade ocorre no meio da fase estacionária (CHERIF *et al.*, 2001). Na estirpe B439 de *B. thuringiensis*, a produção de thuricina 439 (A e B) se inicia no fim da fase exponencial e se mantém durante a fase estacionária (AHERN *et al.*, 2003). Bacthuricina F4 alcança sua maior atividade no meio da fase estacionária (KAMOU *et al.*, 2005). Nas bacteriocinas Morricina 269 e kurstacina 287, a produção se inicia no começo da fase estacionária e alcança seu pico com 26 h de crescimento (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007). Algumas bacteriocinas de *B. thuringiensis*, como a tochicina, entomocina 9, entomocina 110 e thuricina S, tem sua produção iniciada no meio da fase exponencial e seu pico no início da fase estacionária (PAIK *et al.*, 1997; CHERIF *et al.*, 2003; CHERIF *et al.*, 2006; CHEMINI *et al.*, 2007).

O sobrenadante de *B. thuringiensis* S1905 foi testado contra outras estirpes de *B. thuringiensis* e outras espécies de microorganismos (tabela 10).

Tabela 10. Microorganismos testados pelo composto antimicrobiano da estirpe S1905 de *B. thuringiensis*. (+ inibição; - sem inibição).

Estirpes testadas	Incubação		
	Meio de cultura	Temperatura (° C)	Inibição
Gram +			
<i>Bacillus thuringiensis aizawai</i> S616	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis aizawai</i> S1357	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis alesti</i> S655	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis alesti</i> S1268	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis alesti</i> S1296	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis argentiniensis</i> S1168	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis canadensis</i> S1271	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i> S612	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i> S1167	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i> S1184	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i> S1156	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i> S1185	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i> S1270	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis fukuokaensis</i> S608	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i> S597	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i> S958	NYSM	28	-

Estirpes testadas	Incubação		
	Meio de cultura	Temperatura (° C)	Inibição
<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i> S1206	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis indiana</i> S18	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S89	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S159	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S222	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S1806	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> S1989	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i> S109	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i> S599	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis kenyae</i> S617	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis kumamotoensis</i> S1457	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S49	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S93	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S1450	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S1905	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S2193	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> S2195	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis morrisoni</i> S130	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis morrisoni</i> S1265	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis morrisoni</i> S1301	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis muju</i> S1170	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis muju</i> S1180	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis ostrinae</i> S700	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis ostrinae</i> S1261	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis pakistani</i> S1365	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis sotto</i> S615	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis sotto</i> S1165	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis sotto</i> S1193	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i> S1122	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis thuringiensis</i> S39	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis thuringiensis</i> S601	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis tochiensis</i> S202	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis tochiensis</i> S253	NYSM	28	-
<i>Bacillus thuringiensis tohokuensis</i> S141	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i> S62	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i> S75	NYSM	28	+
<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i> S135	NYSM	28	+

Estirpes testadas	Incubação		
	Meio de cultura	Temperatura (° C)	Inibição
<i>Bacillus thuringiensis xianguongies</i> S1178	NYSM	28	-
<i>Bacillus cereus</i> S1181	NYSM	28	+
<i>Bacillus cereus</i> S1183	NYSM	28	+
<i>Bacillus sphaericus</i> S242	NYSM	28	+
<i>Bacillus sphaericus</i> S2362	NYSM	28	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	LB	30	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	LB	30	-
Gram -			
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	LB	30	+
<i>Escherichia coli</i> XL 1 blue	LB	30	-
<i>Escherichia coli</i> Top 10	LB	30	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LB	30	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	LB	30	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	LB	30	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	LB	30	-
Fungos			
<i>Fusarium solani</i>	BDA	25	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	BDA	25	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	BDA	25	-
<i>Sclerotium rolfsii</i>	BDA	25	-

De acordo com a tabela acima diversos subtipos de *B. thuringiensis* foram inibidos pelo composto produzido por S1905. No total de 54 estirpes de *B. thuringiensis* testadas, 35 foram inibidas. A bactéria S1905 não foi inibida pelo seu próprio composto. Duas estirpes de *B. cereus* e duas estirpes de *B. sphaericus* foram testadas e todas inibidas pelo composto. Somente uma bactéria Gram negativa foi inibida, *Escherichia coli* DH5 α . As outras bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas não sofreram inibições. Os fungos fitopatogênicos também não apresentaram nenhum sinal de inibição durante seu crescimento. A capacidade de inibir, principalmente, bactérias relacionadas geneticamente com o produtor, caracterizando um espectro de ação reduzido, é uma das principais características das bacteriocinas, e pode estar relacionado aos aspectos evolutivos (RILEY e WERTZ, 2002b).

As bacteriocinas de *B. thuringiensis* inibem, principalmente, o crescimento de bactérias Gram positivas. Thuricina e tochicina somente inibem espécies de bactérias Gram postivas. A tochicina inibe estirpes de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *Leuconostoc mesenteroides* (FAVRET e YOUSTEN, 1989; PAIK *et al.*, 1997). Thuricina 7 só apresentou inibição para bactérias Gram positivas, como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenssthepanensis*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes* (CHERIF *et al.*, 2001). Entomocina 110 inibe algumas espécies do gênero *Bacillus*, como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. coagulans*, entre outros. Inibe também bactérias do gênero *Paenibacillus*, *Listeria monocytogenes* e *Lacotococcus lactis* (CHERIF *et al.*, 2006). Thuricina 439 (A e B) somente apresentou atividade contra *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *Listeria innocua* (AHERN *et al.*, 2003).

As bacteriocinas entomocina 9 (CHERIF *et al.*, 2003), bacthuricina F4 (KAMOUN *et al.*, 2005), thuricina 17 (GRAY *et al.*, 2006), thuricina S (CHEMINI *et al.*, 2007), morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007) além de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas, inibem também o crescimento de bactérias Gram negativas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella choleraesius*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*. Duas espécies de fungos foram inibidos pela entomocina 9: *Aspergillus nidulans* e *Fusarium graminis* (CHERIF *et al.*, 2003).

4.5 - Efeito de enzimas proteolíticas, pH, temperatura, solventes orgânicos e liofilização sobre o efeito antimicrobiano.

Para o teste de efeito de enzimas proteolíticas, aproximadamente 370 UA/ml de bacteriocina foram testados quanto à sensibilidade à proteinase K e tripsina, e a atividade residual foi mensurada através do “well diffusion method” contra a estirpe S2195 de *B. thuringiensis*. A bacteriocina foi sensível a proteinase K na concentração de 2 mg/ml, mas não foi sensível à tripsina na concentração de 2 mg/ml, indicado que o composto seja de natureza proteica.

Muitas bacteriocinas de *B. thuringiensis* são sensíveis à proteinase K: tochicina (PAIK *et al.*, 1997), thuricina 7 (CHERIF *et al.*, 2001), entomocina 9 (CHERIF *et al.*, 2003), bacthuricina F4 (KAMOUN *et al.*, 2005), entomocina 110 (CHERIF *et al.*,

2006), morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007), thuricina 439 (AHERN *et al.*, 2003), thuricina S (CHEMINI *et al.*, 2007) e thuricina 17 (GRAY *et al.*, 2006). Somente thuricina, kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 são inibidos por tripsina (FAVRET e YOUSTEN, 1989; BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007).

A sensibilidade à proteinase K indica que os compostos são de natureza protéica. Essa protease cliva a proteína em inúmeros pontos, demonstrando pouca especificidade. As bacteriocinas que não apresentam sensibilidade à tripsina, provavelmente não apresentam sítio lítico para essa protease. O sítio de clivagem da enzima tripsina é altamente específico para cadeias laterais positivas dos resíduos de lisina e arginina (LEHNINGER *et al.*, 2004).

No teste com solventes orgânicos, o composto antimicrobiano de S1905 somente foi inativado na presença de butanol. Acetona, metanol e etanol não ocasionaram perda ou redução na atividade do composto. O butanol é um composto com quatro carbonos em sua cadeia e pouco solúvel em água. A perda de atividade do composto pela adição de butanol sugere que o composto seja, em grande parte, de natureza hidrofóbica. Etanol, metanol e acetona são todos solventes polares hidrofílicos. Eles reagem com a parte hidrofílica do composto antimicrobiano, não inibindo a atividade desse. A entomocina 110, após tratamento com etanol, metanol, butanol, acetona e tolueno manteve com sua atividade normal (CHERIF *et al.*, 2006).

No teste de termosensibilidade, o composto foi incubados em diferentes temperaturas e o resultado é apresentado na tabela 11.

Tabela 11. Atividade residual do composto antimicrobiano de S1905 após incubação em diferentes temperaturas.

Temperatura (° C)	Atividade Residual (%)
- 80	100
- 20	100
4	100
Temperatura ambiente	100
30	100
40	90
50	70
60	35
70	15
80	0
90	0
120	0

A partir de 40° C, o composto apresentou perda parcial da atividade. Após 80° C, a atividade é totalmente perdida. A atividade também se mantém para temperaturas baixas. Esse composto manteve a atividade quando incubado a -80° C, -20° C e 4° C. As características de termoestabilidade também são vistas em outras bacteriocinas de *B. thuringiensis*. Morricina 269 e kurstacina 287 são consideradas termotolerantes e mantêm sua atividade até 80° C (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007). Na thuricina 439 (A e B) não há perda de atividade até 80° C e esta desaparece quando incubada a 120° C por 15 minutos (AHERN *et al.*, 2003). A thuricina S, quando incubada a 121° C por 10 min, perde completamente su atividade (CHEMINI *et al.*, 2007). Bacthuricina F4 é

estável até 70° C e quando incubado a 90° C, mantém 20% da atividade residual. Esta bacteriocina também mantém 100% de atividade quando incubada a - 80° C, -20° C e 4° C por 48h (KAMOU *et al.*, 2005; WOO-JIN *et al.*, 2008). A thuricina 17 mantém 100% de sua atividade quando submetidos a -20° C e 4° C (GRAY *et al.*, 2006; WOO-JIN *et al.*, 2008).

As outras bacteriocinas de *B. thuringiensis* descritas na literatura são mais resistentes do que as citadas anteriormente. A tochicina (bacteriocina de *B. thuringiensis* subsp. *tochigiensis*) suporta temperaturas de até 90° C (PAIK *et al.*, 1997). A thuricina 7 também apresenta termoestabilidade quando incubada em temperaturas elevadas. Essa bacteriocina mantém 90% de sua atividade quando incubada a 90° C (CHERIF *et al.*, 2001). Entomocina 9 e entomocina 110 mantém atividade residual de 72% e 53%, respectivamente, quando incubadas a 121° C por 20 min (CHERIF *et al.*, 2003; CHERIF *et al.*, 2006). As bacteriocinas kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 são consideradas termoresistentes por manterem a atividade até temperaturas de 121° C (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007). A thuricina 17 não sofre alteração em sua atividade quando incubado a 100° C (GRAY *et al.*, 2006).

No teste de pH, a atividade do composto de S1905 foi estável entre os pH 2.0 e 7.0. Em pH's 8.0, 9.0 e 10.0 não foi detectada atividade. Outras bacteriocinas de *B. thuringiensis* também apresentam essas características. A bacthuricina F4 é estável entre os pH's 3.0 e 7.0. Após 7.0 a atividade diminui (KAMOU *et al.*, 2005). Morricina 269 e kurstacina 287 apresentam 100% de atividade em pH 5.0. Porém em pH 9.0 sua atividade diminui 60% (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007). As outras bacteriocinas de *B. thuringiensis* são mais tolerantes em relação ao pH. Tochicina, thuricina 7, entomocina 9 e entomocina 110 mantêm sua atividade estável entre os pH's 3.0 e 9.0 (PAIK *et al.*, 1997; CHERIF *et al.*, 2001; CHERIF *et al.*, 2003; CHERIF *et al.*, 2006). Kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524 são mais resistentes a pH extremos. Essas bacteriocinas conseguem manter 80% de sua atividade em pH 11.0 (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007).

O sobrenadante de S1905 foi submetido ao processo de liofilização. Quando liofilizado, o sobrenadante de S1905 manteve sua atividade. Várias concentrações foram testadas em placa através do “well diffusion method” e um gráfico foi gerado (Figura 13). A medida que a concentração do sobrenadante aumenta, o tamanho do halo também aumenta, sugerindo que o sobredante suporta as condições de liofilização. As

bacteriocinas bacthuricina F4, entomocina 9 e thuricina 7 também não apresentam modificações em suas atividades após a liofilização de seus sobrenadantes (CHERIF et al., 2001; CHERIF et al., 2003; KAMOU et al., 2005;).

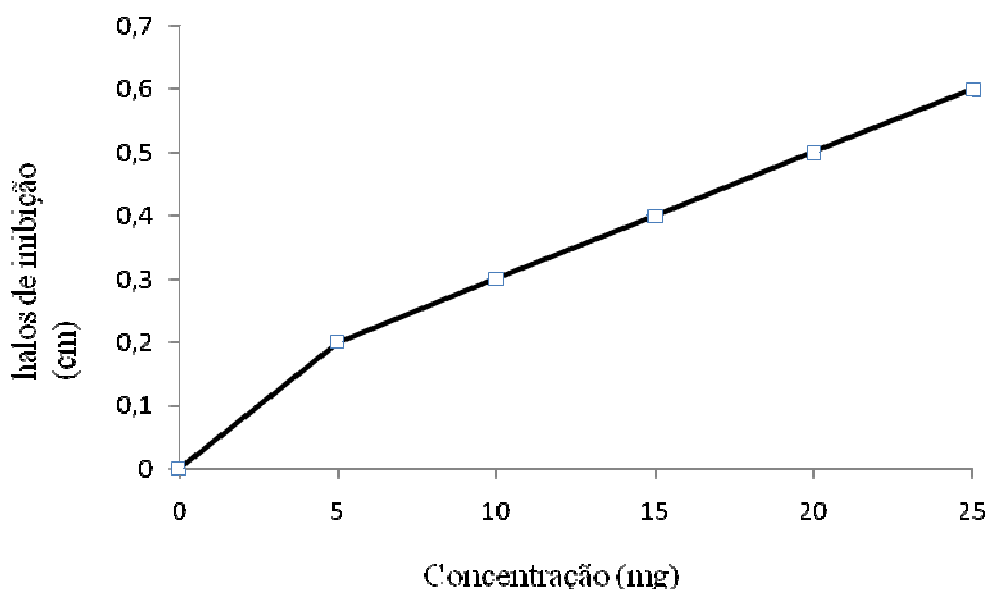


Figura 13. Análise do efeito da liofilização sobre o sobrenadante de *B. thuringiensis* S1905 através do “weel diffusion method”.

4.6 - Clonagem e sequenciamento do gene da bacteriocina

A partir de códons preferenciais de *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis* os oligonucleotídeos NEB-F2 e BEB-R foram desenvolvidos para o sequenciamento da região upstream e downstream do gene da thuricina 17. Pelo fato destes oligonucleotídeos apresentarem múltiplos sítios de ligação, os oligonucleotídeos NEB17albAup e Thur17dn foram desenhados.

Esses oligonucleotídeos foram utilizados para o sequenciamento do gene da bacteriocina de *B. thuringiensis* S1905. O resultado esperado era a amplificação de cópias do gene da bacteriocina da estirpe S1905, baseando-se no fato de que as bacteriocinas de *B. thuringiensis* são conservadas.

Os produtos de amplificação do gene *ThnS1905* por PCR podem ser observados na figura 14. A amplificação pelo par de oligonucleotídeos NEB - F2 e NEB - R gerou vários fragmentos, onde o fragmento com maior amplificação apresentava, aproximadamente, 450 pb. Nas colunas T₁ e P₁ observa-se a presença de múltiplos sítios

de ligação de oligonucleotídeo. Esse resultado é semelhante ao de LEE *et al.* (2009). A amplificação pelo segundo par de oligonucleotídeos (NEB 17albAup e Thur17dn) gerou um fragmento de, aproximadamente, 1000 pb.

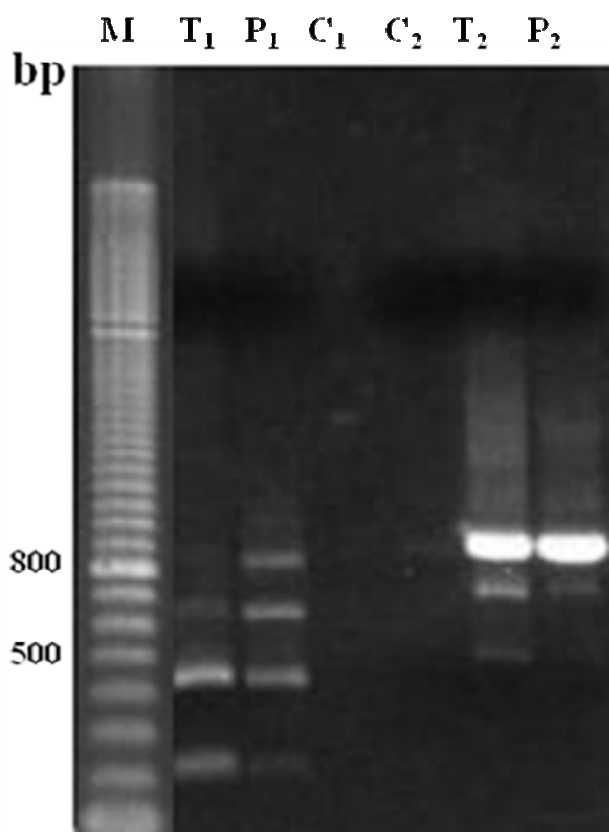


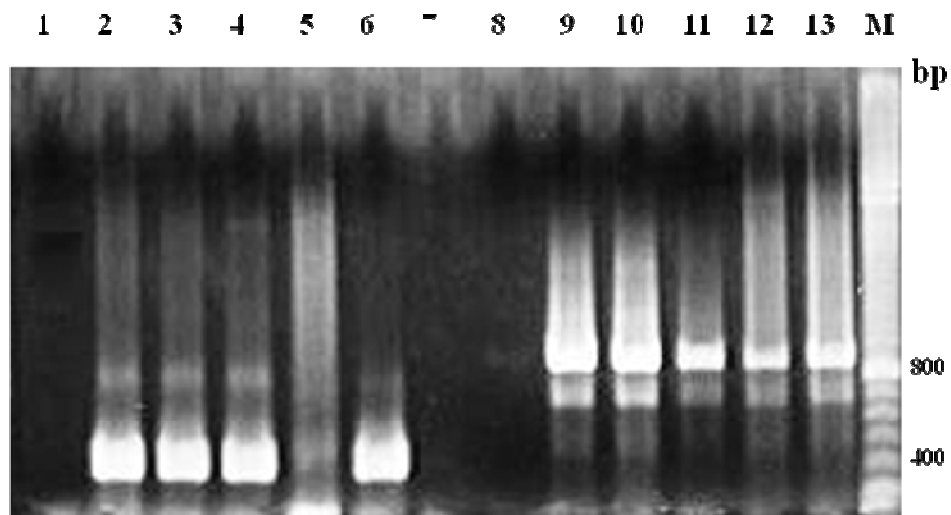
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,0% com produto de amplificação indicando a presença de gene de bacteriocina por PCR do DNA de *B. thuringiensis* S1905. Oligonucleotídeos NEB – F2 e NEB – R (poços T₁, P₁ e C₁), e NEB17albAup e Thur17dn (poços C₂, T₂ e P₂): M – marcador 100 bp DNA ladder (Promega); 1 – DNA total; 2 – DNA plasmidial; 3 - Controle sem DNA; 4 – Controle sem DNA; 5 – DNA total; 6 – DNA plasmidial.

Na figura 14, pode ser observado que os fragmentos amplificados a partir do DNA total e plasmidial, aparentemente, possuem o mesmo tamanho. Isso sugere que o gene *ThnS1905* possa estar localizado em algum plasmídeo da estirpe S1905 de *B. thuringiensis*. Recentemente, KAMOUN *et al.* (2009) identificou o gene associado a bacthuricina F4 em um plasmídeo.

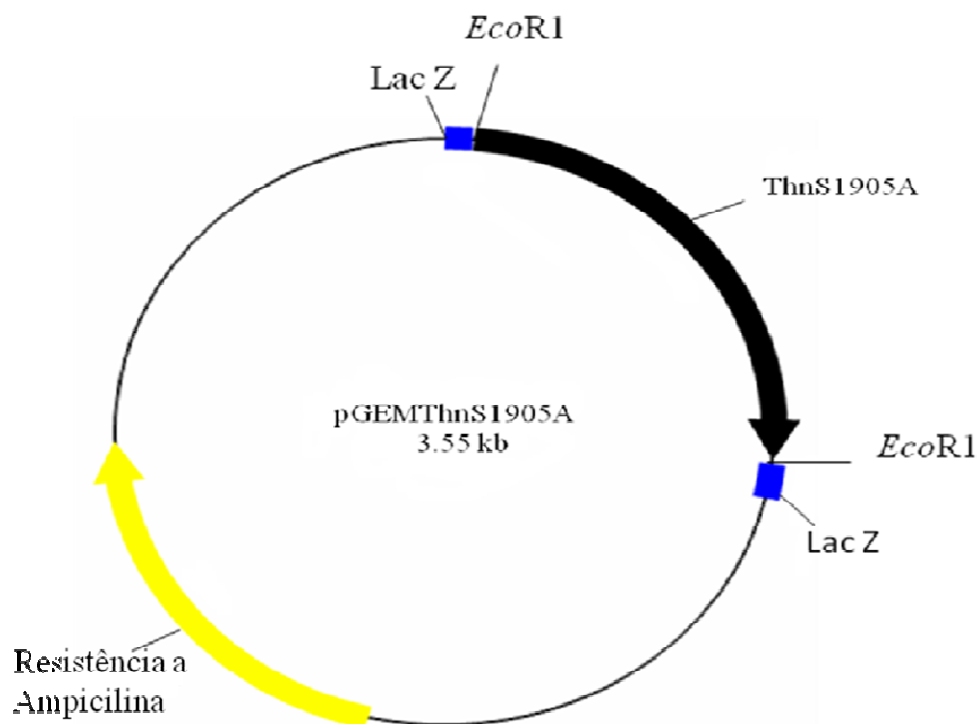
Os fragmentos de 450 pb e 1000 pb foram excisados do gel e eluídos. Posteriormente esses fragmentos foram clonados em vetor pGEM – T easy, originando o plasmídeo pGEMThnS1905A e pGEMThnS1905B (450 pb e 1000 pb,

respectivamente). A confirmação da inserção por amplificação a partir dos oligonucleotídeos descritos previamente e os plasmídeos pGEMThnS1905A e B podem ser observados na figuras 15A, 15B e 15C, respectivamente. A análise da restrição com a enzima *EcoR*I pode ser observada na figura 16.

A)



B)



C)

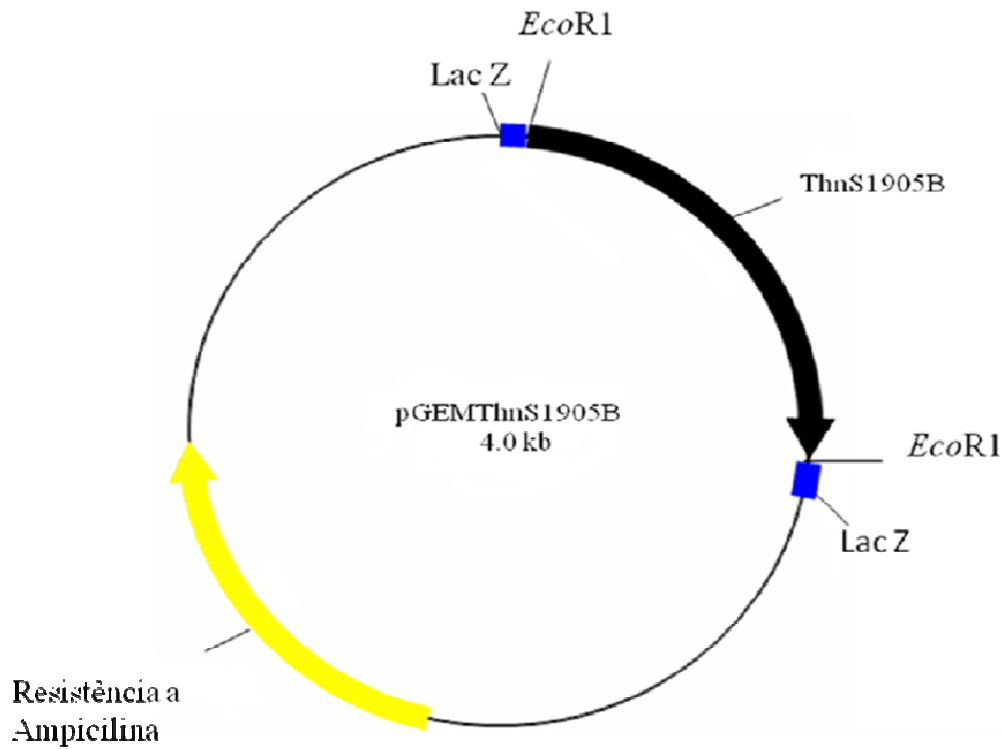


Figura 15: A) Eletroforese em gel de agarose 1,0% da amplificação por PCR a partir do DNA dos clones recombinantes de *E. coli* DH5 α : M – marcador 100 bp DNA ladder (Promega); 1 – controle sem DNA e com oligonucleotídeos NEB – F2 e NEB – R; 2 – 6 – DNA de clones com fragmento amplificados pelos oligonucleotídeos NEB – F2 e NEB – R; 8 – controle (sem DNA) dos oligonucleotídeos NEB 17 albAup e Thur17dn; 9 – 13 –DNA de clones com fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos NEB 17 albAup e Thur17dn. B) Mapa do plasmídeo pGEMThnS1905A.C) Mapa do plasmídeo pGEMThnS1905B.

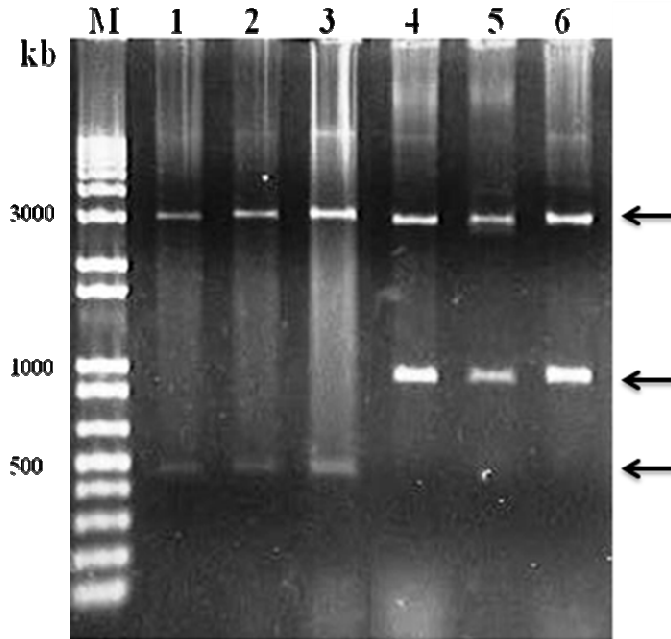


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 0,8% com digestão dos plasmídeos pGEMThnS1905A e B: M – marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1-3 – resultado da digestão com *EcoRI* do plasmídeo contendo o fragmento amplificado pelo oligonucleotídeo NEB – F2 e NEB – R; 4-6 – resultado da digestão com *EcoRI* do plasmídeo contendo o fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos NEB17albAup e thur17dn. As setas indicam, de cima para baixo, o fragmento de DNA correspondente ao plasmídeo pGEM linear e os fragmentos liberados pela digestão dos plasmídeos recombinantes.

Os clones positivos foram sequenciados com os oligonucleotídeos universal e reverso. As sequências foram analisadas no software BioEdit e um contig foi obtido. O contig revelou que a sequência dos dois clones estavam sobrepostas. Assim, a sequência menor foi descartada e os demais trabalhos foram realizados, somente, com a maior sequência. A sequência do fragmento amplificado de 1.007 pares de bases (pb) corresponde ao possível gene *ThnS1905* pode ser observada na figura 17.

A análise pelo programa ORF FINDER (disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov) revelou a existência de 3 ORFs (*thnS1*, *thnS2* e *thnS3*) dispostas em tandem na sequência e todos os três genes codificam a mesma bacteriocina, thuricina S1905 (Figura 16). Na região upstream de *thnS1* foram preditos a região promotora – 10 e três prováveis sítios de ligação do ribossomo, localizados 8 pb antes de cada códon iniciador (ATG) dos três genes estruturais. Um provável sítio de

terminação de transcrição *rho* independente (677-723) foi identificado após a sequência *thnS3* (Figura 18).

Figura 17. Sequência completa do gene da thuricina S1905. Em vermelho estão demarcadas as sequências correspondentes aos oligonucleotídeos Thur17dn e NEB 17 albAup que se anelam nas posições 1-24 e 934-952, respectivamente. Em azul claro estão marcadas as sequências correspondentes aos oligonucleotídeos NEB-F2 e NEB-R que se anelam nas posições 568-589 e 990-1007, respectivamente.

1 taaacatagggaattatactta~~gtgc~~accacacaatacagaaaaa~~gggggggta~~g~~ttca~~aat~~ggaa~~aacaccagta~~gtaca~~accaa~~gggggact~~gggactt 96
97 gttggagttgtttatgtgcagcatggtctctgtggattataattagtta~~ctgc~~ggcaac~~gggggctact~~gtcaag~~ctata~~atcccttcagaa~~ggtt~~ 198
199 ttttggttaaaagcactaa~~ggaa~~t~~gaa~~t~~gaa~~ctttt~~gtca~~aatt~~gaa~~cttct~~gaa~~g~~gaa~~aaaataaataatcaaaa~~gggggaa~~gtat~~gtt~~ctataat~~ggaa~~aca 297
298 cca~~gt~~agta~~ca~~acc~~aa~~gggggatt~~gg~~actt~~gtt~~ggagtt~~gtt~~ctta~~gtat~~gtcagcat~~gtt~~ct~~gt~~ggaa~~ttata~~att~~gtta~~ct~~gtc~~ggcaac~~gggggct~~agt 399
400 act~~g~~caagctataatccttttagaa~~gtttttt~~ggttaa~~ggta~~ctaa~~ggaa~~t~~gaa~~ctttt~~gtca~~aat~~gttt~~ctaga~~ggaaaa~~ataataaac~~caaa~~ 501
502 aaggagatggttcta~~aat~~ggaaacac~~cag~~ta~~gtaca~~acc~~aa~~gggggatt~~gg~~actt~~gtt~~ggagtt~~gtt~~ct~~ta~~ta~~gtc~~agca~~gttt~~ct~~gt~~ta~~ggag~~gttattaaatcta 603
604 gttact~~gtc~~ggcaacc~~gg~~agct~~ag~~ta~~gtca~~agtt~~aa~~aaat~~taaa~~at~~gtg~~aa~~gtttt~~at~~gtt~~g~~aa~~aatt~~aa~~aatt~~gaa~~ctt~~at~~ctata~~gtca~~aaac~~agtt~~ta 705
706 t~~gtt~~aa~~g~~aa~~ta~~agctctat~~at~~att~~atc~~g~~aa~~aac~~g~~at~~gg~~at~~gg~~at~~ttt~~tt~~gt~~aaatac~~ata~~aaact~~aa~~aa~~ca~~aatt~~ta~~aa~~ttt~~at~~ata~~gg~~at~~g~~at~~g~~at~~taaa~~g~~ttga 807
808 at~~gg~~ct~~at~~tt~~at~~ttt~~gg~~aaaa~~g~~ct~~aga~~aat~~ag~~aa~~at~~tcac~~ata~~aa~~at~~ta~~g~~aat~~ct~~at~~gtt~~gg~~ta~~ttc~~ata~~aaaa~~cccc~~aaac~~g~~aaa~~g~~gg~~ctc~~ 906
907 ctac~~gt~~tt~~aa~~aac~~g~~aaa~~ata~~c~~at~~tt~~ta~~c~~g~~ata~~ata~~aaa~~cccc~~act~~g~~aa~~at~~tt~~g~~at~~ta~~att~~g~~at~~gt~~act~~aa~~aac~~ata~~t~~gg~~ac~~at~~g~~tt~~gg~~ctc~~tt~~gtt~~ 1007

Figura 18. Sequência completa do gene da thuricina S1905 com as análises do ORF Finder. Em sublinhado estão as regiões -10 do promotor e as três regiões de ligação a ribossomo. Em laranja estão demarcadas as sequências que codificam a thuricina S1905 (*thnS1*, *thnS2* e *thnS3*). Os nucleotídeos em cor verde representam um sítio de terminação de transcrição com estrutura em “stem loop”.

1 taaaacataggggggttacttactgctgcaccacacatacagaagaaaggggggttagctcaaa tgggaaacaccagtagtatacaaaccaaggggacttggacttt 96
97 gtttggaggtttgttagtctgcaagcagtcttctgtaggaa ttataaatttagtta ctgctggcaacaaggggctagctactgcaagctaa tatcctttcagaagtt 198
199 tttttggftaaagcactaaagaaatgtagcacttttggctcaaattagacttcttagggagaaaaa taataatcaaaaaggggggtgttctaaatgggaaaca 297
298 ccagtagtaacaacaaaggggattggacttggctggagttcttagtta tggctcagca gtttctgctggaa ttataaatttagctactgctggcaacaaggggctagt 399
400 actgcaagctaaatcctctttagaagtttttgggttaaagttactaaagttactaaagaaatgtagcacttttggctcaaa tgaatttcttagaagaaaaataataacaaa 501
502 aaaggggatgtttctaaatgggaaacaccagtagtacaaccaaagggtttggacttggactttagtta tggctcagca gtttctgtagagttattataaacta 603
604 gtttactgctggcaaccgggctagctactgcaagttaaatftttaa atgtagaggtttta tgggtgaaatfaaatgaggactttacta tggcaaacagttta 705
706 tgttagaataagctctatatatttactgaaaacgtagtagggggtttttgttaacataaacataaaa caaatftaaatttatagggaga tgaattaaagtga 807
808 atggctatttttggaaaaagctagaaa taagaaaaatcacatcaaa ttagaacta tgtttggtagttca taaaaaccacaacggaaaaagcgtc 906
907 ctacgcttaaaaacgaaaaatactttacgataaa taaaaccgcactgaaatfattgggttaattgtaggttaattgtaggtta ctaaaacatagggacatgcttggcttggtt 1007

As sequências *thnS1*, *thnS2* e *thnS3* codificam o mesmo pré-peptídeo de 40 aminoácidos, METPVVQPRDWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS. Eles consistem em um peptídeo-sinal (METPVVQPR) de 9 aminoácidos e uma bacteriocina de 31 aminoácidos (DWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS). Apesar de codificar o mesmo pré-peptídeo, as sequências *thnS1*, *thnS2* e *thnS3* apresentam diferenças na sequência nucleotídica. Existem diferenças pontuais que não alteram a sequência protéica nas posições 30, 48, 72, 85, 102, 105 e 120. As diferenças podem ser observadas em detalhe na figura 19.

```

thnS1 ATGGA AACACCAGTAGTACAACCAAGGGACTGGACTTGTGGAGTTGTTTAGTATGIGCA 60
thnS2 ATGGA AACACCAGTAGTACAACCAAGGGATTGGACTTGTGGAGTTGCTTAGTATGIGCA 60
thnS3 ATGGA AACACCAGTAGTACAACCAAGGGATTGGACTTGTGGAGTTGCTTAGTATGIGCA 60
*****

thnS1 GCAIGTTCTGTGGAATTATTA AATTTAGTTACTGCGGCAACAGGGGCTAGTACTGCAAGC 120
thnS2 GCAIGTTCTGTGGAATTATTA AATTTAGTTACTGCGGCAACAGGGGCTAGTACTGCAAGC 120
thnS3 GCAIGTTCTGTAGAGTTATTA AATCTAGTTACTGCGGCAACCGGAGCTAGTACTGCAAGT 120
***** **

thnS1 TAA 123
thnS2 TAA 123
thnS3 TAA 123
***

```

Figura 19. Alinhamento das três ORF's do gene da thuricina S1905 através do software CLUSTALW2 (disponível no site www.ebi.ac.uk/clustalW).

O fragmento de 1007 pb de *ThnS1905* foi submetido a análise por BLAST e seu resultado revelou alta identidade com três sequências do GenBank: *ThnS1905* apresenta 97% de identidade com o plasmídeo pBc239 de *B. cereus*; 98% de identidade com a sequência da thuricina H, uma bacteriocina de *B. thuringiensis* SF361; e 99% de identidade com o gene da thuricina 17, bacteriocina de *B. thuringiensis* NEB17.

A análise da sequência da bacteriocina thuricina H revelou que a região do promotor -10 e os sítios de ligação dos ribossomos são exatamente iguais aos da sequência *ThnS1905*. A distância entre o sítio de ligação de ribossomo e o códon de início de cada thuricina S1905 (*thnS1*, *thnS2* e *thnS3*) também é idêntica, 8 pb. A presença de um sítio de terminação de transcrição com uma estrutura em forma de “stem loop” também ocorre na sequência da thuricina H, e essa estrutura apresenta a

mesma sequência da estrutura encontrada na thuricina S1905 (LEE, H. *et al.*, 2009). A organização estrutural dos três genes estão representados na figura 20.

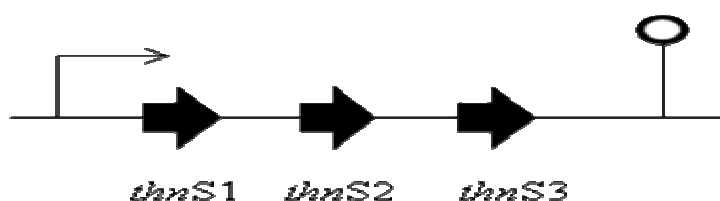


Figura 20. Organização genética dos genes estruturais da thuricina S1905. A seta fina no início representa o promotor e a estrutura em forma de pirulito representa o sítio de terminação da transcrição. As setas em preto simbolizam as três sequências que codificam, cada uma, o peptídeo thuricina S1905.

A análise por BLASTP revelou semelhança com três proteínas hipotéticas com funções desconhecidas: proteína hipotética BCQ_PI102 (*B. cereus* Q1), proteína hipotética bthur 0007_54080 (*B. thuringiensis* subsp. *monterrey* BGSC 4AJ1) e proteína hipotética BCAH 1134_C0273 (*B. cereus* AH1134). A proteína hipotética de *B. thuringiensis monterrey* BGSC 4AJ1 é 100% idêntica a proteína completa thuricina S1905. As outras apresentam 100% de identidade, porém não se estende por toda a proteína. Resultado semelhante ocorreu para a thuricina H quando analisada pela mesma ferramenta (LEE, H. *et al.*, 2009).

Sequências de quatro bacteriocinas de *B. thuringiensis* e uma de *B. cereus* mostraram alta identidade com a sequência da thuricina S1905: bacthuricina F4 (DWTXWSXL), thuricina S (DWTXWSXLVXAACSVELL), thuricina 17 (DWTCWSCLVVAACSVELL), thuricina H (DWTCWSCLVCAACSVELL-NLVTAATGASTAS) e cereína MRX1 (DWTCWSCLVCAACCSVELL), onde X corresponde a aminoácidos não identificados (KAMOUN *et al.*, 2005; GRAY *et al.*, 2006a; CHEMINI *et al.*, 2007; SEBEI *et al.*, 2007; LEE, H. *et al.*, 2009).

4.7 - Análises *in silico*, modelagem e SDS-PAGE de bacteriocina

O peptídeo maduro da thuricina S1905 contém 31 aminoácidos, sendo composta por uma glicina (G), um ácido glutâmico (E), uma asparagina (N), um aspartato (D), dois triptofanos (W), três valinas (V), quatro treoninas (T), quatro serinas (S), quatro

leucinas (L), quatro cisteínas (C) e seis alaninas (A). A sua massa molecular teórica calculada é 3147.6 Da e o seu pI teórico, 3.67.

A massa molecular teórica da thuricina S1905 (3147.6 Da) é levemente diferente da massa de outras bacteriocinas de *B. thuringiensis* e de *B. cereus*: Bacthuricina F4 (3160.05 Da), thuricina S (3137.61 Da), thuricina 17 (3162.3 Da), thuricina 439 A e B (2919.9 Da e 2803.8 Da, respectivamente), thuricina H (3139.51 Da) e cereína MRX1 (3137.93 Da) (AHERN *et al.*, 2003; KAMOUN *et al.*, 2005; GRAY *et al.*, 2006a; CHEMINI *et al.*, 2007; SEBEI *et al.*, 2007; LEE, H. *et al.*, 2009). A massa molecular calculada da thuricina S1905 apresenta o mesmo valor do que a massa calculada da thuricina H. O pI teórico é bastante semelhante, sendo o pI da thuricina H de 3.67 (LEE, H. *et al.*, 2009).

O software Peptide Cutter analisou a thuricina S1905 e gerou a tabela abaixo (Tabela 13). As enzimas Endopeptidase Asp-N + N-terminal Glu, BNPS-Skatole, quimiotripsina de alta e baixa afinidade, ácido fórmico, endopeptidase glutamil, ácido benzóico, ácido 2-nitro-5-tiocianobenzóico, pepsina (pH 1.3), pepsina (pH>2), proteinase K, peptidase I de *Staphylococcal* e termolisina apresentaram potenciais sítios de clivagem na thuricina S1905. As outras enzimas não apresentaram sítios de clivagem nessa bacteriocina. Esse resultado está de acordo com os resultados obtidos nos testes com enzimas proteolíticas. Incubação com proteinase K inibiu a atividade da thuricina S1905, enquanto a incubação com tripsina não alterou a atividade do composto (ver seção 5.5).

Tabela 12. Potenciais sítios de clivagem por enzimas ou substâncias químicas para a sequência da thuricina S1905.

$\begin{array}{ccc} 10 & 20 & 30 \\ \text{DWTCWSCLVC} & \text{AACSVELLNL} & \text{VTAATGASTA S} \end{array}$

Nome da substância	Número de clivagens	Posição dos sítios de clivagem
Endopeptidase Asp-N + N-Terminal Glu	1	15
BNPS-Skatole	2	2; 5
Quimotripsina de baixa afinidade	6	2; 5; 8; 17; 18; 20
Quimotripsina de alta afinidade	2	2; 5
Ácido Fórmico	1	1
Endopeptidase glutamil	1	16
Ácido benzóico	2	2; 5
Ácido 2-nitro-5-tiocianobenzóico	4	3; 6; 9; 12
Pepsina (ph 1.3)	11	1; 2; 4; 5; 7; 8; 16; 17; 18; 19; 20
Pepsina (ph>2)	7	7; 8; 16; 17; 18; 19; 20
Proteinase K	19	2; 3; 5; 8; 9; 11; 12; 15; 17; 18; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 27; 29; 30
Peptidase I de <i>Staphylococcus</i>	1	16
Termolisina	12	7; 8; 10; 11; 14; 17; 19; 20; 22; 23; 26; 29

O software TMHMM deduziu que a região transmembrânica da bacteriocina thuricina S1905 está localizada entre os aminoácidos 5 e 27 (WSCLVCAACSVELL-NLVTAATGA) (Figura 21). A porção N-terminal do peptídeo, localizada entre os aminoácidos 1 e 4 (DWTC), representa a parte intracelular do peptídeo, enquanto a

porção C-terminal, localizada entre os aminoácidos 28 e 31 (STAS), representa a parte extracelular do peptídeo.

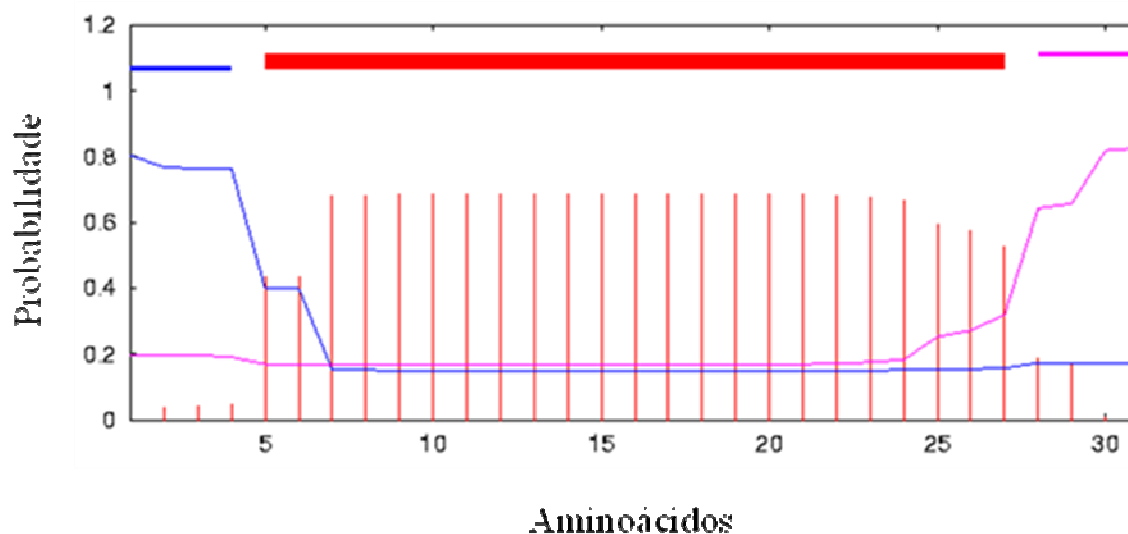


Figura 21. Análise da bacteriocina thuricina S1905 pelo software TMHMM. Em azul estão representados os aminoácidos correspondentes a parte intracelular do peptídeo. Em vermelho estão destacados os aminoácidos presentes na região transmembrânica e, em rosa, os aminoácidos presentes na parte extracelular desse peptídeo. Eixo y representa a probabilidade, de 0 a 1, da predição estar certa.; eixo x representa os aminoácidos da sequência analisada.

A análise da hidrofobicidade do peptídeo por meio do método de Kyte & Doolittle revelou uma alta região hidrofóbica entre os aminoácidos 7 e 12, que correspondem nos aminoácidos CLVCAA (Figura 22). Abaixo de zero estão localizados os aminoácido hidrofílicos, localizados entre os aminoácidos 1-4 e 28-31, o que corrobora com a análise do software TMHMM na figura 16. GRAY *et al.* (2006b) também analisaram a thuricina 17 quanto a hidrofobicidade pelo método de Kyte & Doolittle. Nessa bacteriocina também existe uma região com alta hidrofobicidade entre os aminoácidos 8 e 12, correspondente aos aminoácidos LVVAA, o que reforça o conceito de hidrofocbicidade para a região N-terminal desse peptídeo.

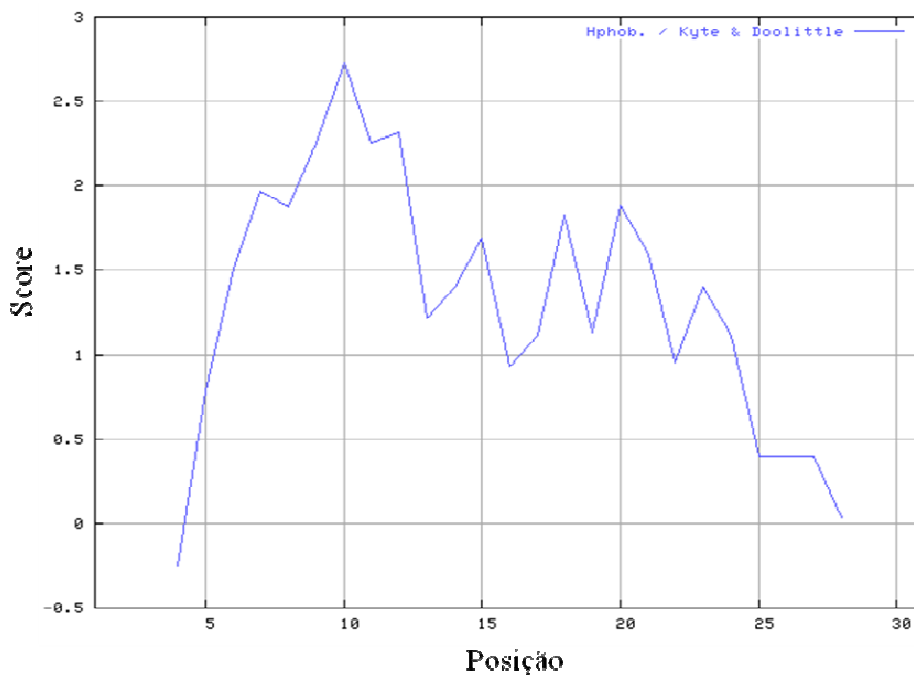


Figura 22. Análise de hidrofobicidade através do método Kyte & Doolittle. O tamanho da janela escolhida foi sete. A análise foi realizada em software localizado no servidor EXPASY. Eixo y representa o score obtido para cada aminoácido. Scores acima de 0 representam regiões hidrofóbicas e valores acima de 1.5 representam regiões muito hidrofóbicas.

A análise pelo software CLUSTALW2 permitiu o alinhamento das sequências de bacteriocinas de *B. thuringiensis*. Três sequências foram analisadas: thuricina 17, thuricina H e thuricina S1905. A figura 18 ilustra os aminoácidos idênticos e conservados. Entre essas três sequências os aminoácidos são todos conservados, com exceção da valina na posição 10 da sequência. Thuricina 17 apresenta valina enquanto a thuricina H e a thuricina S1905 apresentam a cisteína. Bacthuricina F4, thuricina S e cereína MRX1 não foram colocadas no alinhamento por apresentar aminoácidos não sequenciados ou somente parte da sequência total do peptídeo. Porém todos esses peptídeos contêm seus N-terminais idênticos (DWTCWSCL) aos das thuricinas apresentadas na figura 23.

```

Thuricina S1905 DWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS 31
Thuricina H    DWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS 31
Thuricina I-  DWTCWSCLVVAACSVELLNLVTAATGASTAS 31
*****

```

Figura 23. Alinhamento das bacteriocinas de *B. thuringiensis* através do CLUSTALW2. Os asteriscos representam os aminoácidos conservados.

GRAY *et al.* (2006b) sugeriram a criação de uma nova sub-classe de bacteriocinas baseado no fato da thuricina 17 apresentar o seu N-terminal semelhante ao com o da bacthuricina F4. Thuricina 17, thuricina H, bacthuricina F4, thuricina S, thuricina S1905 e cereína MRX1 apresentam suas sequências muito conservadas. E essa conservação pode ocorrer dentro de duas espécies distintas, já que cereína MRX1 é uma bacteriocina de *B. cereus*. As bacteriocinas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* podem apresentar essa conservação por fazerem parte do mesmo grupo dentro do gênero *Bacillus*. Apesar dessa similaridade há uma bacteriocina de *B. thuringiensis* que apresenta uma sequência distinta dessas outras bacteriocinas: thuricina 439. Na figura 24 observa-se o alinhamento das bacteriocinas thuricina S1905, thuricina H, thuricina 17 e thuricina 439.

```

Thuricina S1905 DWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS 31
Thuricina H    DWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS 31
Thuricina 17  DWTCWSCLVVAACSVELLNLVTAATGASTAS 31
Thuricina 439 GWVAX----VGAXGTVVL-----ASGGVV-- 20
               .*..      .* .. :*      *:* . .

```

Figura 24. Alinhamento de quatro bacteriocinas de *B. thuringiensis* através do software CLUSTALW2. (*) aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos conservados; (.) aminoácidos semi-conservados.

Observa-se que existem cinco aminoácidos idênticos: triptofano, duas alaninas, glicina e leucina. Ainda apresentam dois aminoácidos conservados e oito aminoácido semi-conservados. A thuricina 439 não apresenta o N-terminal DWTCWSCL e, assim, não pode ser colocada no mesmo grupo das outras bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

Analisando as bacteriocinas thuricina H e thuricina S1905 observa-se a presença de quatro cisteínas (em cinza), o que indica a possibilidade de formação de duas pontes dissulfeto. De acordo com FIMLAND *et al.* (2000) essas estruturas conferem maior estabilidade ao peptídeo. Nessas bacteriocinas os resíduos de cisteína são separados por dois outros aminoácidos criando a fórmula CXXCXXCXXC. HAFT (2009) analisou bacteriocinas de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. licheniformes* e encontrou quantidade

similares de cisteína e de espaçamento entre esses resíduos. Em *B. anthracis* o resíduo de cisteína sempre vem seguido de duas glicinas enquanto em *B. licheniformes* a cisteína vem seguida de triptofano e serina. Nas bacteriocinas thuricina H, thuricina 17, thuricina S1905 e cereína MRX1, o primeiro resíduo de cisteína é seguido de triptofano e serina (Figura 25).

Thuricina H	D W T C W S C L V C A A C S V E L L N L V T A A T G A S T A S
Thuricina S1905	D W T C W S C L V C A A C S V E L L N L V T A A T G A S T A S
Thuricina 17	D W T C W S C L V V A A C S V E L L N L V T A A T G A S T A S

Figura 25. Análise das bacteriocinas thuricina H, thuricina S1905 e thuricina 17.

Em preto estão marcados os resíduos de triptofano. Esses resíduos podem ser importantes na interação do peptídeo com a membrana. Em bacteriocinas da classe IIa (tipo pediocinas) os resíduos de triptofano contribuem para o correto posicionamento e estruturação da ligação na membrana e para a atividade antimicrobiana por ser um resíduo aromático e hidrofóbico (FIMLAND et al., 2005).

O software I-TASSER gerou cinco modelos da thuricina S1905. O modelo com o valor mais alto do “C-score” (- 0,84) foi escolhido. A figura 26 representa o modelo tridimensional da thuricina S1905, destacando as duas moléculas de triptofano e as duas pontes dissulfeto formados pelas quatro cisteínas, estruturas importantes para a função desse peptídeo. Esse modelo foi analisado pelo software PROCHECK gerando o gráfico de Ramachandran (Figura 27).

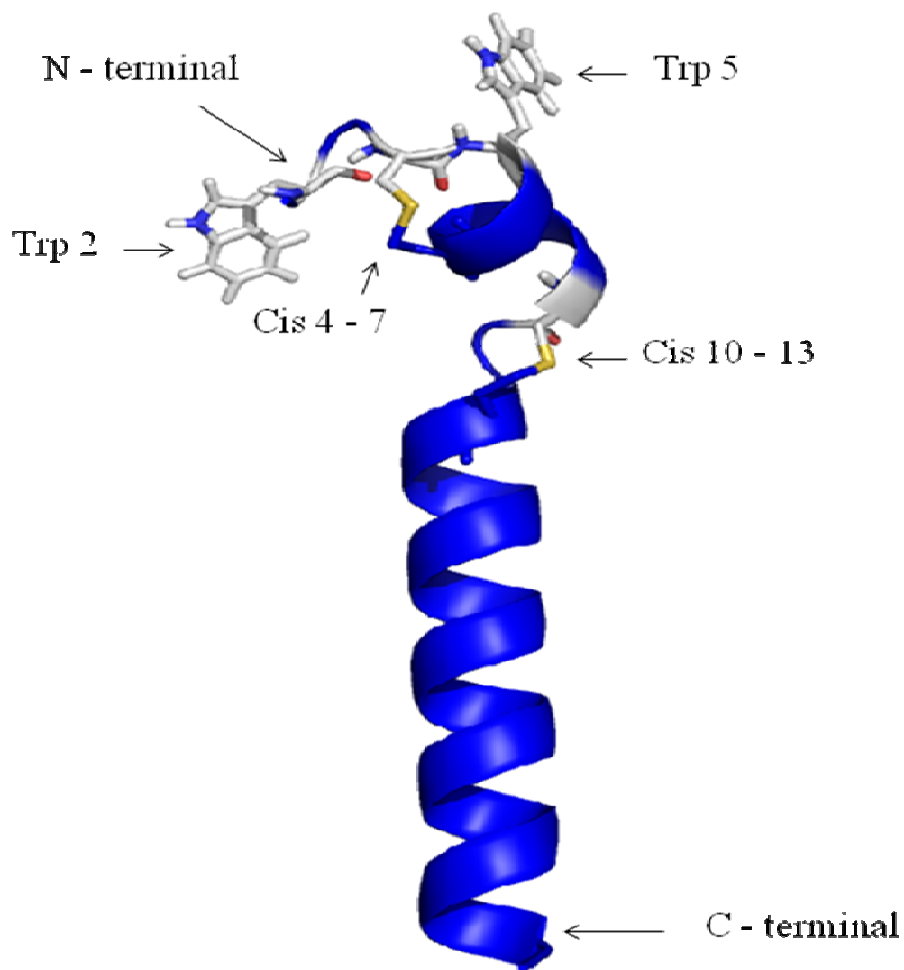


Figura 26. Estrutura tridimensional (modelo teórico) do peptídeo thuricina S1905. O modelo foi produzido por modelagem *ab initio* através do software I-TASSER. No modelo estão destacados o N- e o C- terminal, as moléculas de triptofano (Trp) e as pontes dissulfeto (Cis, em amarelo).

Neste gráfico a alanina está fora de sua predição. Isso ocorre por que a cisteína 10 impede a alanina de formar a estrutura em forma de hélice. Entre os templates utilizados, o que apresentou o melhor alinhamento foi a proteína pardaxina. Essa proteína é produzida por glândulas de muco em peixes e tem função ictiotóxica (PORCELLI *et al.*, 2004). Ela interage com membrana celulares e causa morte por formação de poro ou de canais iônicos.

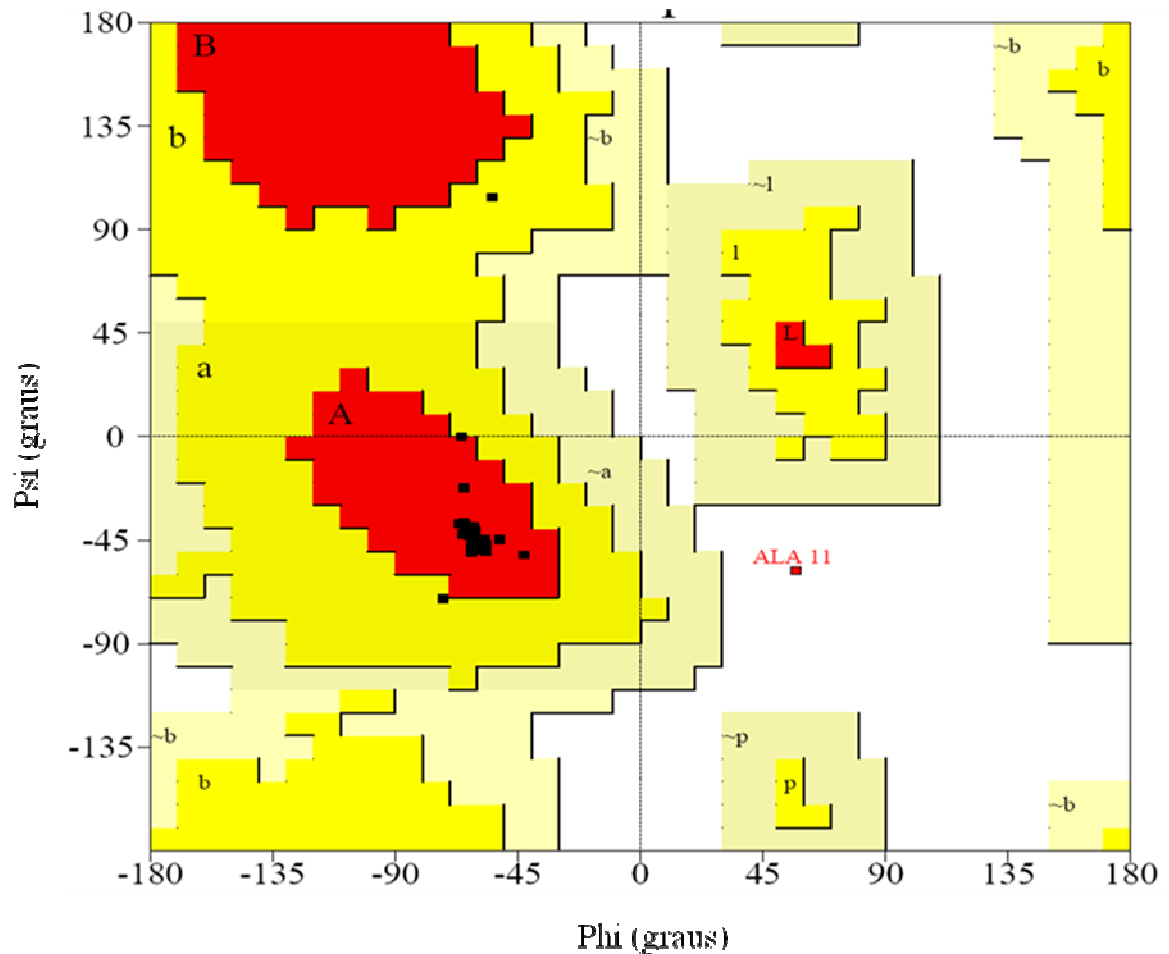


Figura 27. Plot de Ramachandran para o modelo teórico do peptídeo thuricina S1905. O gráfico foi gerado a partir do software on line Procheck. As regiões vermelhas representam regiões mais favoráveis e as amarelas, permitidas. Os pontos pretos representam os aminoácidos.

O gráfico de Ramachandran (figura 27) apontou o modelo teórico como sendo favorável. O resíduo da região não permitida é a alanina 11. Ela está nessa região, pois a cisteína 10 impede a formação de sua hélice e, portanto, esse aminoácido não está na sua orientação favorável.

O gráfico de superfície eletrostática é representado na figura 28. Nela podemos ver que, praticamente, o peptídeo inteiro apresenta carga negativa, ou seja, é aniônico. Peptídeos antimicrobianos, na maioria das vezes, são catiônicos (KLAENHAMMER, 1993; JACK *et al.*, 1995). Assim, thuricina S1905 representa uma exceção a maioria das bacteriocinas.

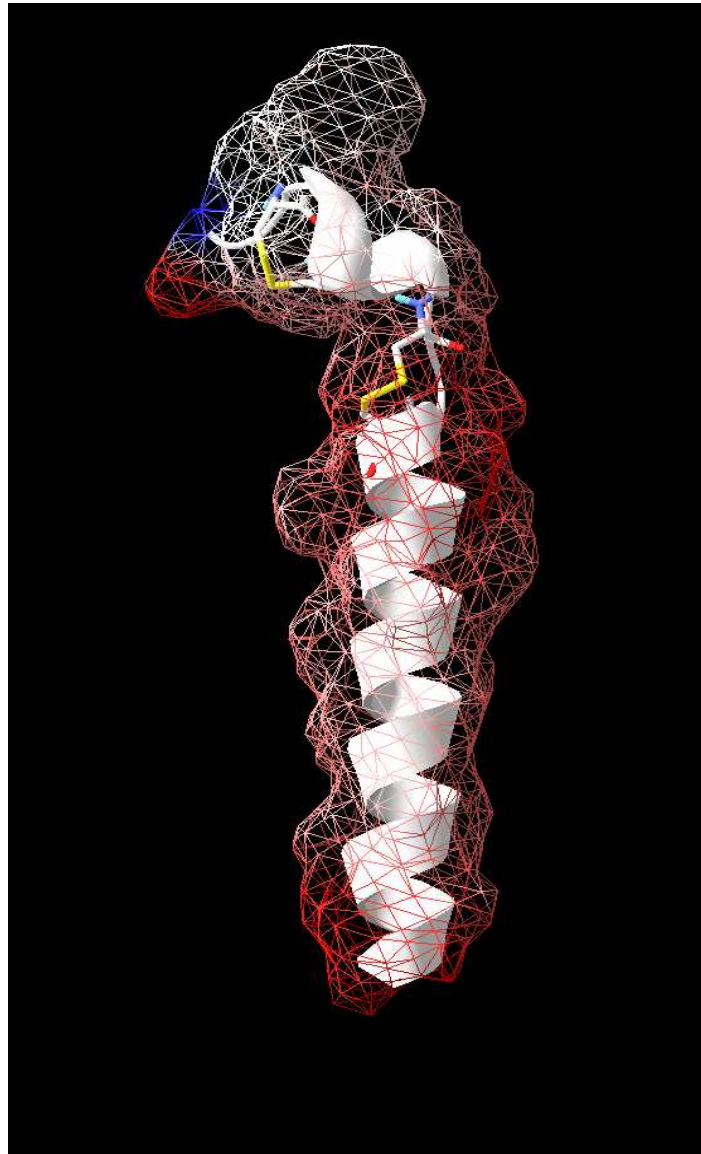


Figura 28. Superfície eletrostática da thuricina S1905. A região marcada em azul representa carga positiva; em vermelho, carga negativa; em branco, carga neutra.

O modo de ação de peptídeos antimicrobianos aniônicos não é conhecido (SHELBURNE *et al.*, 2007). Sabe-se que a presença de zinco no meio é necessária para a atividade máxima de peptídeos aniônicos. BROGDEN *et al.* (2003) sugeriram que o zinco pode formar uma ponte catiônica que atrai esses peptídeos para a carga negativa da superfície microbiana. Em subtilosina A, bacteriocina aniônica de *B. subtilis*, acredita-se que a atividade depende da interação com receptores na membrana, similar

ao que ocorre com o peptídeo nisina (WIEDEMANN *et al.*, 2001). Experimentos em modelos de membrana com fluorescência e NMR (Ressonância Magnética Nuclear) sugerem que a ligação com a membrana externa, resultando em uma permeabilização na membrana, também é um mecanismo possível (THENNARASU *et al.*, 2005). Esses tipos de mecanismos diferem dos utilizados por peptídeos catiônicos, no qual ocorre uma interação direta com a membrana celular, causando a morte da bactéria (RAMAMOORTHY *et al.*, 2006).

CHEMINI *et al.* (2010), por meio de um corante fluorescente, provou que a thuricina S interage com a membrana plasmática para dissipar o potencial transmembrânico. Também foi demonstrado, nesse estudo, que essa bacteriocina age como uma bacteriocina formadora de poro, já que esse peptídeo permite a entrada na célula do corante não permeável de iodato de propídio

Sabendo a massa molecular da thuricina S1905, foram analisadas amostras de sobrenadante filtrado e sobrenadante liofilizado em gel de poliacrilamida com tris-tricina. Os perfis das proteínas do sobrenadante filtrado e liofilizado podem ser visualizados na figura 29.

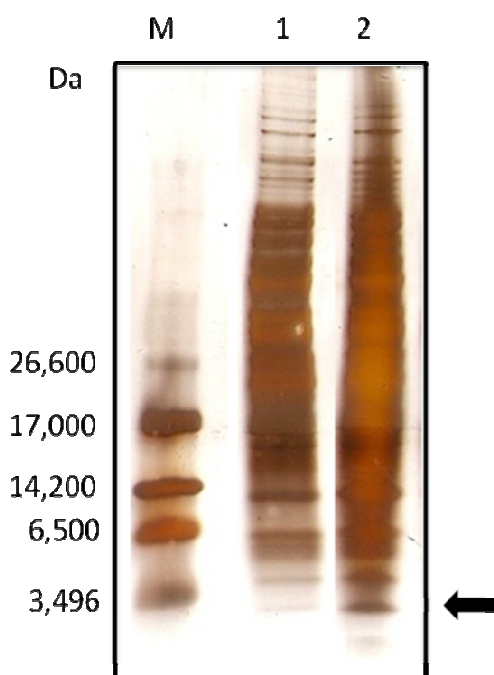


Figura 29. SDS-PAGE com tris-tricina do sobrenadante filtrado e liofilizado de cultura de *B. thuringiensis* S1905. Vinte microlitros de sobrenadante filtrado e 5 mg de sobrenadante liofilizado foram aplicados nos poços 1 e 2, respectivamente. M – marcador Ultra Low Range Molecular Weight Marker (Sigma); 1 – sobrenadante filtrado; 2 – sobrenadante liofilizado. A seta indica o possível peptídeo thuricina S1905.

Observa-se na figura 27a presença de peptídeos abaixo do marcador de 3,496 Da. A seta indica o possível peptídeo que representa a thuricina S1905, que apresenta uma massa molecular de 3,147 Da. Esse peptídeo está presente em ambos sobrenadante filtrado e sobrenadante liofilizado.

As várias características das bacteriocinas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* foram analisadas e uma tabela foi organizada com a maioria das características dessas bacteriocinas e suas respectivas referências (Tabela 13).

Tabela 13. Principais características das bacteriocinas de *B. thuringiensis* e cereína MRX1 de *B. cereus*.

Bacteriocina	Microorganismos inibidos	temperatura	pH	Fase de produção	Protease	Sequência protéica	Massa molecular	Referência
Tochicina	Gram +	Até 90° C	3.0- 9.0	Início da fase log; ápice no início da fase estacionária	Proteinase K	Não conhecida	10,5 kDa	FAVRET; YOUSTEN, 1989
Thuricina 7	Gram +	Até 90° C	3.0- 9.0	fim da fase log; ápice no meio da fase estacionária	Proteinase K	Não conhecida	11,6 kDa	CHERIF <i>et al.</i> , 2001
Entomocina 9	Gram +, Gram - e Fungo	Até 121° C	3.0- 9.0	Meio da fase log; ápice no início da fase estacionária	Proteinase K	Não conhecida	12,44 kDa	CHERIF <i>et al.</i> , 2003
Thuricina 439A e B	Gram +	Até 80° C	2.0- 9.0	Fim da fase log; atividade mantida durante fase estacionária	Proteinase K Pronase E	GWVAVXGAXGTVVLASGGVV	2919,9 Da e 2803,8	AHERN <i>et al.</i> , 2003
Bacthuricin F4	Gram + e Gram -	Até 70° C	3,0 a 7,0	ápice no meio da fase estacionária	Proteinase K Alcalase	DWTXWSXL	3160,05 Da	KAMOUM <i>et al.</i> , 2005
Entomocina 110	Gram +	Até 121° C	3.0- 9.0	Meio da fase log; ápice no início da fase estacionária	Proteinase K	Não conhecida	7,5 kDa	CHERIF <i>et al.</i> , 2006
Morricina 269	Gram + e Gram -	Até 80° C	5.0- 9.0	Início da fase estacionária; ápice no meio da fase estacionária	Proteinase K	Não conhecida	10 kDa	BARBOZA-CORONA <i>et al.</i> , 2007
Kurstacina 284								
Kenyacina 404	Gram + e Gram -	Até 121° C	5.0- 11.0	Meio da fase log; ápice no início da fase estacionária	Proteinase K Tripsina	Não conhecida	10 kDa	BARBOZA-CORONA <i>et al.</i> , 2007
Entomocina 420								
Tolworthicina 524								
Thuricina S	Gram + e Gram -		3.0- 10.5	Meio da fase log; Ápice no início da fase estacionária	Proteinase K	DWTXWSXLVXAACSVELL	3137,61 Da	CHEMINI <i>et al.</i> , 2007
Thuricin 17	Gram + e Gram -	Até 100° C	1.0- 9.0	Não conhecida	Proteinase K	DWTCWSCLVWAACSVELL	3162,3	GRAY <i>et al.</i> , 2006a; GRAY <i>et al.</i> , 2006b
Thuricina H	Gram +	Não conhecida	Não conhecida	Não conhecida	Não conhecida	NLVTAATGASTAS	3139,51 Da	Lee, K.D. <i>et al.</i> , 2009
Thuricina S1905	Gram +	Até 70° C	2.0-7.0	Fim da fase exponencial; Ápice no meio fase estacionária	Proteinase K	DWTCWSCLVWAACSVELL	3147,6	Não publicado
Cereína MRX1	Gram +	Até 100° C	3.6-8.0	Não conhecida	Proteinase K actinase E α -quimotripsina	NLVTAATGASTAS DWTXWSXLVXAACSVELL	3137,93	SEBEI <i>et al.</i> , 2007

Conclusões gerais e Perspectivas

- De sete estirpes de *B. thuringiensis* e duas de *B. sphaericus* obtidas do Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S1905 mostrou ter uma maior espectro de ação do que as outras estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* testadas.
- A produção do composto antimicrobiano, possivelmente causado pela thuricina S1905, se inicia no fim da fase exponencial e alcança seu ápice no meio da fase estacionária.
- O composto antimicrobiano inibe estirpes de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e uma estirpe de *E. coli*.
- O composto antimicrobiano é termotolerante e mantém a atividade em até temperaturas de 70 °C por 30 min.
- O composto antimicrobiano apresenta estabilidade entre os pH's 2.0 e 7.0.
- O gene da thuricina S1905 foi identificado como sendo um gene de bacteriocina por apresentar 98% de identidade com o gene a thuricina H e 99% com a thuricina 17.
- O gene da thuricina S1905 codifica três peptídeos iguais: METPVVQPRDWTCWSCLVCAACSVELLNLVTAATGASTAS.
- A purificação e o sequenciamento protéico devem ser realizados, para comprovar que a atividade do sobrenadante de *B. thuringiensis* S1905 seja causada pela thuricina S1905.

- Testes com fungos e bactérias patogênicas deverão ser realizados para determinação da atividade dessa bacteriocina contra microorganismos de importância clínica.
- Experimentos de crescimento de plantas deverão ser realizados, já que a thuricina 17 apresenta a função de efector de crescimento em plantas e a thuricina S1905 tem alta identidade com esse peptídeo.

Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1996. Portaria DETEN/MS nº 29. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_96.htm>. Acesso em: 05/11/2009.

AHERN, M.; VERSCHUEREN, S. e VAN SINDEREN, D. Isolation and characterization of a novel bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. FEMS Microbiol. Lett. v. 162, p. 229-236, 2003.

ARONSON, A.I., BECKMAN, W. e DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. v. 50, p. 1-24, 1986.

BAKER, D. e SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. Science. v. 294, n. 5540, p. 93-96, 2001.

BARBOZA-CORONA, J.E. *et al.* Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch. Microbiol. v. 187, p. 117-126, 2007.

BIZANI, D. Purificação e caracterização da bacteriocina cereína 8A, produzida por uma linhagem de *Bacillus cereus*. 2004. 124p. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BIZANI, D. *et al.* Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocins-like peptide produced by *Bacillus cereus*. Int. Microbiol. v. 8, n. 2, p. 125-131, 2005.

BLUM, H.; BEIER, H. e GROSS, H.J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis. v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Microbiol. and Mol. Biol. Rev. v. 31, n. 4, p. 230-314, 1967.

BRAVO, A.; GILLB, S.S. e SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. IATROU, K.; GILL, S. (Eds.) Comprehensive molecular insect science. Amsterdam: Elsevier BV, 2005. p. 175-206.

BRAVO, A., GILLB, S.S. e SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon. v.49, p. 423-435, 2007.

BROGDEN, K.A. *et al.* Antimicrobial peptides in animals and their role in host defense. Int. J. Antimicrob. Agents v. 22, p. 465-478, 2003.

BRÖTZ, H. *et al.* Role of lipid-bound peptideoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. Mol. Microbiol.v. 30, p. 317-327, 1998.

CAO, Z. e KLEBBA, P.E. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. Biochimie. v. 84, n. 5-6, p. 399-412, 2002.

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

CASCALES, E. *et al.* Colicin biology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 71, p. 158-229, 2007.

- CERÓN, J. Productos comerciales: natives y recombinants. *In*: BRAVO, A.; CERÓN, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2004. p. 123-147.
- CHAO, L. e LEVIN, B.R. Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. PNAS. v. 78, n. 10, p. 6324-6328, 1981.
- CHEIGH, C.I.; PYUN, Y.R. Nisin biosynthesis and its properties. Biotechnology Letters. v. 27, n. 21, p. 1641-1648, 2005.
- CHEMINI, S. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. v. 53, p. 284-290, 2007.
- CHEMINI, S. *et al.* Mode of action of thuricin S, a new class IId bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. v. 56, n. 2, p. 162-167, 2010.
- CHEN, H. e HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive reviews in food science and food safety. v. 2, p. 82-100, 2003.
- CHERIF, A. *et al.* Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7, a new strain isolated from soil. Lett. Appl. Microbiol. v. 32, p. 243-247, 2001.
- CHERIF, A. *et al.* Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9. J. Appl. Microbiol. v. 95, p. 990-1000, 2003.
- CHERIF, A. *et al.* Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. Microbiological Research. v. 163, n. 6, p. 684-692, 2008.

CINTAS, L.M. *et al.* Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science and Technology International. v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.

CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. v.71, p. 1-20, Jun. 2001.

COTTER, P.D., HILL, C. e ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews/Microbiology. v. 3, p. 777-788, Oct. 2005.

CRICKMORE *et al.*, Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CZÁRÁN, T.L.; HOEKSTRA, R.F. e PAGIE, L. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 99, n. 2, p. 786-790, 2002.

DAYEM *et al.* The putative immunity protein of the Gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment, FEMS Microbiol. Lett. Amsterdam, v. 138, n. 2-3, p. 19-37, 1996

DELGADO *et al.* Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. J. Microbiol. Meth. Amsterdam, v. 62, p. 121-124, 2005.

DE VUYST, L. e VANDAMME, E.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic & Professional, 1994. 540 p. *Apud* BIZANI, D. Purificação e caracterização da bacteriocina cereína 8ª, produzida por uma linhagem de *Bacillus cereus*. 2004. 124 p. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DRIDER, D. *et al.* The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 70, n.2, p. 564-582, 2006.

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

DUAN, K. *et al.* Identification and characterization of a mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded nisin resistance determinant. J. Appl. Bacteriol. v. 81, p. 493-500, 1996.

DYKES, G.A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. Trends in ecology & evolution. v. 10, n. 5, p. 186-189, 1995.

ENNAHAR *et al.* Class IIA bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev. v. 24, p. 85-106, 2000b.

FARKAS, J. *et al.* The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. Collect. Czech. Chem. C.: v. 34, p. 1118-1120, 1969.

FAUST, R.M. e BULLA, A.L.JR. Bacterial and their toxins as inseticides. *In*: KURSTAK, E. (Ed.) Microbial and viral pesticides. New York: Marcel Dekker, 1982, p. 75-206.

FIMLAND *et al.* Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. J. Peptide Sci. v. 11, n. 11, p. 688-696, 2005.

GILLOR, O.; ETZION, A. e RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl. Microbiol. and Biotech. v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GLARE, T.R. e O'CALLAGHAM, M. Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety. Chirchester: John Wiley, 2000. 350 p.

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. e PANG, C.H.N. The genus Bacillus. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, 1973. *Apud* DROBNIIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. Cli. Microbiol. Rev. v. 6, n.4, p. 324-338, 1993.

GRAY, E.J. *et al.* A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB 17: isolation and classification. J. Appl. Microbiol. v. 100, p. 545-554, 2006a.

GRAY, E.J. *et al.* Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB17. FEMS Microbiol. Lett. v. 255, p. 27-32, 2006b.

GRAY, M.L. e KILLINGER, A. *Listeria monocytogenes* and listerial infections. Microbiol. and Mol. Biol. v. 30, n. 2, p. , 1966.

HABIB, M.E.M. e ANDRADE, C.F.S.. Bactérias entomopatogênicas. *In*: ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ/USP, 1998. p.383-446.

HAFT, D.H. A strain-variable bacteriocin in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* with repeated Cys-Xaa-Xaa motifs. Biology Direct. v. 4, p. 15-20, 2009.

HANSEN, B.M. e SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* *In*: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A. e NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.41-64.

HE, L.; CHEN, W. e LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocins-like peptides by *Bacillus licheniformes* ZJU12. Microbiol. Res. v. 161, n. 4, p. 321-326, 2006.

HENG, N.C.K. *et al.* The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. *In*: RILEY, M.A.; CHAVAN, M. (Eds) Bacteriocins: ecology and evolution. New York: Springer-Verlag, 2006, 150 pp.

HYRONIMUS, B.; LE-MARREC, C. e URDACI, M.C. Coagulin, a bacteriocins-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. J. Appl. Microbiol. v. 85, p. 42-50, 1998.

INGRAM, L. Synthesis of the antibiotic nisin: formation of lanthionine and β -methyllanthionine. Biochim. Biophys. Acta v.184, p. 216-219, 1969.

INGRAM, L. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. Biochim. Biophys. Acta v. 224, p. 263-265, 1970.

JACK, R.W.; TAGG, J.R. e RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiol. Rev. v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.

JACOB, F. *et al.* Définition de quelques termes relatifs à la lysogenie. *Annales de L'Institut Pasteur, Paris*, v. 84, p. 222-224, 1953. *Apud* BIZANI, D. Purificação e caracterização da bacteriocina cereína 8^a, produzida por uma linhagem de *Bacillus cereus*. 2004. 124 p. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

JOERGER, R.D. *et al.* Bacteriocins. *In*: LEDEMBERG, J. *et al.* (Ed.) Encyclopedia of microbiology, v. 1, 2^o edition, San Diego: Academic Press Inc., 2000, p. 383-397.

KAMOUN, F. *et al.* Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. v. 98, p. 881-888, 2005.

KAMOUN, F. *et al.* Generation of mini-Tn10 transposon insertion mutant library of *Bacillus thuringiensis* for the investigation of genes required for its bacteriocins production. FEMS Microbiol. Lett. v. 294, p. 141-149, 2009.

KAUFMANN, G.F. *et al.* Revisiting quorum sensing: discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 102, p. 249-258, 2005.

KEER, B. *et al.* Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. Nature. v. 418, p. 171-174, 2002.

KIM, L. Advanced Engineered Pesticides: Technology and Engineering. New York: Marcel Dekker Inc., 1993. 448 p

KIMURA *et al.* Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, v. 864, p. 345-348, 1998.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

KLEEREBEZEM, M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autorregulate their own biosynthesis. Peptides. v. 25, n. 9, p. 1405-1414, 2004.

KNOWLES, B.H. e DOW, J.A.T. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. BioEssays v. 15, p. 469-476, 1993.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. In: EVANS, P.D. (Ed.) Advances in insect physiology. London: Academic Press and Harcourt Brace and Co., 1993. 361 p.

KOLTER, R. E MORENO, F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. v. 46, p. 141-163, 1992.

KRIEG, A. Concerning (alpha)-exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. J. Invertebr. Pathol. v. 17, p. 134-135, 1971.

KYTE, J. e DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. v. 227, p. 680-685, 1970.

LECHNER, M. *et al.* Molecular characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. Molec. Microbiol. v.3, p. 621-626, 1989.

LEE, H.; CHUREY, J.J. e WOROBO, R.W. Biosynthesis and transcriptional analysis of thuricin H, a tandem repeated bacteriocins genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. FEMS Microbiol. Lett. v. 299, p. 205-213, 2009.

LEE, K.D. *et al.* The class IId bacteriocins thuricin-17 increases plant growth. Planta. v. 229, p. 747-755, 2009.

LENSKI, R.E. e RILEY, M.A. Chemical warfare from an ecological perspective. PNAS. v. 99, n. 2, p. 556-558, 2002.

LEVINSON, B. *et al.* Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 3172-3179, 1990.

LOGUERCIO, L.L.; CARNEIRO, P. N. e CARNEIRO, A. A. Milho Bt: Alternativa biotecnológica para o controle biológico de insetos pragas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. 24, p. 46-52, jan/fev 2002.

MAAGD, R.A. BRAVO, A. De e CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, v. 4, n.1, p. 193-199, 2001.

McMULLEN, L.M. e STILES, M.E. Potential for use of bacteriocins-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.* p. 64-71, 1996.

MEAD, P.S. *et al.* Food-related illness and death in the United States . *Emerging Infect. Dis.* v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MEDEIROS, P.T. *et al.* Avaliação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. *Horticultura brasileira*, v.24, p. 245-248, 2006.

MEYER *et al.* Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. v. 10, p. 19-37, 2009.

MOLL, G. N.; KONINGS, W.N. e DRIESSEN, A.J.M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antoine van Leeuwenhoek*. v. 76, n1-4, p. 185-198, 1999.

MONNERAT, R.G. e BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-200.

MONNERAT, R.G. e PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G. Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicas de Controle de Pragas. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

MORENO, I. Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de Lactococos e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal. 1995.203 p. Dissertação (Tese de Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

NACLERIO, G. *et al.* Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4313-4316.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Principles of Biochemistry. 4ª Ed. New York: W.H. Freeman, 2004. 1100 p.

NES, I.F. *et al.* Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antoine van Leeuwenhoek. v. 70, n.2-4, p.113-128, 1996.

NESTER, E.W. *et al.* '100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment', Report, American Academy of Microbiology, Washington, DC, 2002.

NISSEN-MEYER, J. *et al.* Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Current Pharmaceutical Biotechnology. v. 10, p. 19-37, 2009.

NOVOTNY JUNIOR, J.F. e PERYYY, J.J. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleoverans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. Appl. Environ. Microbiol. v. 58, n. 8, p. 2393-2396, 1992.

OPPEGARD, C. *et al.* Analysis of two peptides bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. Appl. Environ. Microbiol. v. 73, n.9, p. 2931-2938, 2007.

OKEREKE, A. e MONTVILLE, T.J. Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. Appl. Environ. Microbiol. v. 58, n. 8, p. 2463-2467, 1992.

PAIK, H.D.; BAE, S.S. e PAN, J.G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. v. 19, p. 294-298, 1997.

PARKER, M.W. e FEIL, S.C. Pore forming protein toxins: from structure to function. Prog. Biophys. Mol. Biol. v. 88, p. 91-142, 2005.

POLANCZYK, R. e ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. Agrociência. v. 2, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R.A.; SILVA, R.F.P. e FIUZA, L.M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). R. Bras. Agrociência. v. 10, n. 2, p. 209-214, 2004.

PORCELLI, F. *et al.* Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes. J. Biol. Chem. v. 279, p. 45815-45823, 2004.

PRICE, L.B. e SHAND, R.F. Halocin S8: a 36-amino-acid Microhalocin from the haloarchael strain S8a. Journal of Bacteriology. v. 182, n. 17, p. 4951-4958, 2000.

PRIEST, F.G. Biodiversity of the entomopatogenic, endospore-forming bacteria. *In*: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN LE-ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-22.

PUGSLEY, A.P. e OUDEGA, B. Methods of studying colicins and their plasmids. *In*: HARDY, K.G (ed.). Plasmids: a practical approach. Oxford: IRL Press, p. 105-161, 1987.

QUADRI *et al.* Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacterium B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. J. Bacteriol. San Diego, v. 177, n. 5, p. 1144-1151, 1995

RAMAMOORTHY, A. *et al.* Deletion of all cysteines in tachyplesin I abolishes hemolytic activity and retains antimicrobial activity and lipopolysaccharide selective binding. Biochemistry. v. 45, p. 6529-6540, 2006.

REEVES, P. The bacteriocins. Bacteriological Reviews, Baltimore, v. 29, p. 25-45, 1965.

RILEY, M.A. e WERTZ, J.E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie. v. 84, n. 5-6, p. 357-364, 2002a.

RILEY, M.A. e WERTZ, J.E. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. Annu. Rev. Microbiol. v. 56, p. 117-37, 2002b.

RILEY, M. e GORDON, D.M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends in Microbiology, Cambridge, v.7, p. 129-133, 1999.

RODRIGUEZ-VALERA, F.; JUEZ, G. e KUSHNER, D.J. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. Can. J. Microbiol. v. 28, p. 151-154, 1982.

ROSA, C.M. e FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. ConSCIENTIAE Saúde Rev. Cient. v. 1, p. 09-15, 2002.

SAMBROOK., J. e RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual.vol.1. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.

SANO, Y. *et al.* Pyocins S1 and S2, bacteriocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *In*: SILVER, S. (Ed.) Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 1990. P. 352-358.

SCHÄGGER, H.e JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry. v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SCHILLINGER, U.; KAYA, M. e LÜCKE, F.K. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J. Appl. Microbiol. v. 70, n. 6, p. 473-478, 1991.

SCHNEIDER, E. e HUNKE, S. ATP-binding- cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. FEMS Microbiol. Rev. Amsterdam, v. 22, p. 1-20, 1998.

SCHÜLLER, F.; BENZ, R. e SAHL, H.G. The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. Eur. J. Biochem. v. 182, p. 181-186, 1989.

SEBEI, S. *et al.* Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. J. Appl. Microbiol. v. 103, n. 5, p. 1621-1631, 2007.

SEBESTA, K. *et al.* Thuringiensin, the Beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H.D. (Ed.) Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London: Academic Press, 1981. p. 249-281.

SETTANNI, L. e CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int. J. Food Microbiol. v.121, n. 2, p. 123-128, 2008.

SHAFIA, F. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. v. 92, n. 2, p. 524-525, 1966.

SHELBURNE, C.E. *et al.* The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocins subtilosin A. JAC. p. 1-4, 2007.

SNEATH, P.H.A. e HOLT, J.G. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: Gram positives other than Actinomycetes. Baltimore: Williams & Wilkins, Co. 1986,

SOBERON, M. e BRAVO, A. Generalidades sobre *Bacillus thuringiensis*. In: Metodologias utilizadas en investigación sobre bacterias entomopatógenas. Cidade do México: CYTED, 2001. 1 CD-ROM

STEIN, T. *et al.* Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. J. Bacteriol. v. 184, n. 6, p. 1703-1711, 2002.

THENNARASU, S. *et al.* Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilosin A. Chem. Phys. Lipids. v. 137, p. 38-51, 2005.

UCSD, University of California, San Diego. *Bacillus thuringiensis*, History of Bt. Disponível em: http://www.bt.uscd.edu/bt_history.html. Acesso em 04/11/2008

VENEMA, K.; VENEMA, G. e KOK, J. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. Trends in Microbiology. v. 3, n. 8, p. 299-304, 1995.

WIEDEMANN, I. *et al.* Specific binding of nisin to the peptideoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. J. Biol. Chem. v. 276, p. 1772-1779, 2001.

WINKOWSKY, K.; LUDESCHER, R.D. e MONTVILLE, T.J. Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. v. 62, p. 323-327, 1996.

WOO-JIN, J. *et al.* Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*. J. Microbiol. Biotechnol. v. 18, n. 11, p. 1836-1840, 2008.

WU, S.; SKOLNICK, J. e ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC Biology*. v. 5, p. 17, 2007.

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

YU, C.G. *et al.* The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63, p. 532-536, 1997.

ZAKHAROV, S.D. e CRAMER, W.A. On the mechanism and pathway of colicin import across the *E. coli* outer membrane. *Frontiers in Bioscience*. v. 9, p. 1311-1317, 2004.

ZHANG, Y. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins*. v. 8, p. 108-117, 2007.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. v. 9, p. 40, 2008.

