

CIRCULAR TÉCNICA

239

Sete Lagoas, MG  
Julho, 2018

# Riscos à Produção de Biopesticida à Base de *Bacillus thuringiensis*

Fernando Hercos Valicente  
Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Ana Clara Pimenta Pereira  
Jessica Letícia Abreu Martins  
Amanda Naye Guimarães Tavares

## Introdução

Os inseticidas químicos, principalmente os de largo espectro, são amplamente utilizados na agricultura brasileira com o objetivo principal de erradicação de insetos-pragas de diversas culturas. Apesar de os inseticidas químicos serem vistos como poluidores do meio ambiente, estes possuem sua importância na agricultura quando usados racionalmente. Estes produtos continuam a ser usados em grande escala na agricultura moderna pela facilidade de serem encontrados no mercado e pela eficiência no controle do inseto-alvo, apesar de não possuírem rápida degradabilidade e serem acumulados em níveis que podem causar danos ao meio ambiente. Além disso, estes produtos frequentemente interferem em comunidades de insetos que se encontram em equilíbrio, tanto no solo quanto nas plantas. Esta interferência pode destruir os inimigos naturais presentes na cultura, contaminar aplicadores, rios e nascentes, além de permitir o surgimento de pragas secundárias. De um modo geral, as pragas secundárias não teriam tanta importância sem o uso indiscriminado destes inseticidas químicos de largo espectro.

Dentro deste contexto, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) desempenha um papel fundamental no controle dos principais insetos-pragas de cada cultura. O MIP pode ser definido como o uso de várias técnicas de controle de insetos. Ele é capaz de preservar e aumentar os fatores de mortalidade natural, mantendo a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico. Dentro do MIP, usam-se técnicas de controle de insetos que incluem o uso de produtos químicos, tratamentos culturais e controle biológico por meio de parasitoides, predadores,

# Riscos à Produção de Biopesticida à Base de *Bacillus thuringiensis*<sup>1</sup>

nematoides, protozoários e patógenos. O MIP tem promovido ganhos significativos de produtividade em várias culturas, podendo-se destacar milho, soja, algodão, feijão, etc. Dentre os patógenos de insetos, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*.

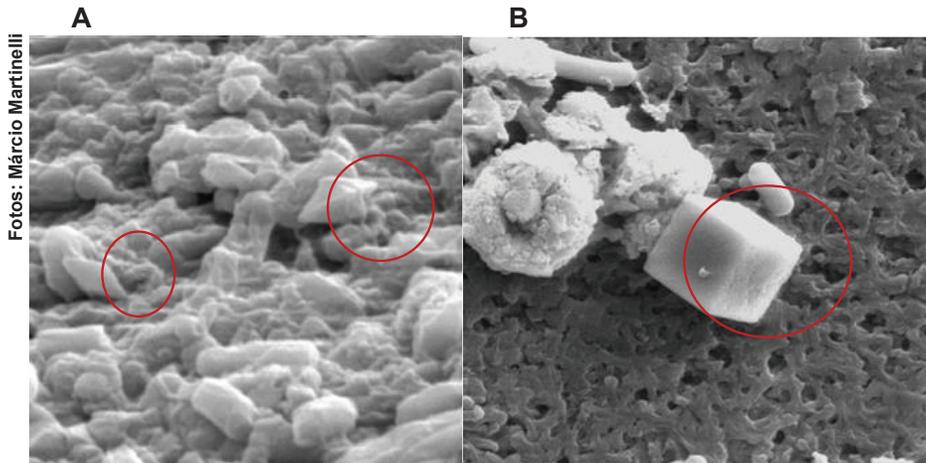
## ***Bacillus thuringiensis***

O *B. thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva, ubíqua, que pode ser caracterizada pela capacidade de formar cristais proteicos durante a fase estacionária e/ou de esporulação. O *Bt* é encontrado naturalmente em diversos habitats, incluindo solo, filoplano, resíduos de grãos, poeira de silos, água, matéria vegetal e insetos. O *Bt* sintetiza toxinas na forma de cristais (Cry) e proteínas citolíticas (Cyt), também conhecidas como delta endotoxinas, que possuem propriedades inseticidas específicas, podendo apresentar várias formas, como bipiramidal (Figura 1A), esférica, retangular, cuboide (Figura 1B) e irregular.

O modo de ação das proteínas Cry em lepidópteros ocorre quando larvas suscetíveis ingerem os cristais que são solubilizados por proteases no pH alcalino do intestino médio do inseto (pH entre 9 e 12), onde as proteínas Cry passam de pró-toxinas (inclusão cristalina) para proteínas resistentes a proteases de 60 a 70 kDa (Bravo et al., 2007). Estas proteínas se inserem em membranas, causando o vazamento de íons e a lise celular, e o inseto morre de septicemia.

---

<sup>1</sup> Eng.-Agrôn., D.Sc. em Entomologia (Genética Molecular), Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; Estudante de Agronomia, Universidade Federal de São João Del-Rei, estagiária na Embrapa Milho e Sorgo; Estudante de Agronomia, Universidade Federal de São João Del-Rei, estagiária na Embrapa Milho e Sorgo; Bolsista Embrapa Milho e Sorgo.



Fotos: Márcio Martinelli

**Figura 1.** Imagem de microscopia eletrônica mostrando os cristais presentes em amostras de *Bacillus thuringiensis*. (A) Imagem com cristal em formato bipiramidal (aumento de 20.000 X). (B) Imagem com cristal em formato cuboide (aumento de 30.000 X). Os círculos vermelhos indicam os cristais.

O *Bt* é ativo contra várias espécies de insetos e é considerado seguro em relação aos mamíferos. Outra vantagem é a especificidade em relação aos insetos-pragas das diferentes culturas. A nomenclatura, até 1998, abrangia quatro genes principais: *cryI*; *cryII*; *cryIII* e *cryIV*. Hoje, por causa do grande número de genes que são estudados e sequenciados, usam-se números arábicos: *cry1*; *cry2*; *cry3*; *cry4*; até *cry75*. Os genes, em suas respectivas classes, produzem proteínas que são tóxicas para determinadas ordens de insetos. Os genes *cry1*, *cry2*, *cry7B*, *cry8D*, *cry9*, *cry15A*, *cry22*, *cry32A* e *cry51A* são específicos para lepidópteros (lagartas); *cry2*, *cry4A*, *cry10*, *cry11*, *cry16*, *cry17*, *cry19*, *cry20*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, 44, 47, 48 e *cry49* são ativos contra dípteros (mosquitos); *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9D*, *cry14A*, *cry18A*, *cry22A*, *cry22B*, *cry23A*, *cry34*, *cry35*, *cry36*, *cry37A*, *cry43*, *cry55*, *cyt1A* e *cyt1C* contra coleópteros (besouros); e *cry5*, *cry6*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry21A* e *cry55A* são ativos contra nematoides. Em razão do grande número de coleções de *Bt* no mundo e suas respectivas subclasses, as sequências gênicas de *Bt* podem ser visualizadas no website [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) (Crickmore, 2018).

## **Crescimento e Cultivo do *Bacillus thuringiensis* como Produto Biológico**

O *Bt* necessita de carbono, nitrogênio e traços de alguns sais ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) para seu crescimento (Valicente; Mourão 2009). Porém, cada isolado de *Bt* pode ter uma necessidade específica e diferente em relação à quantidade de carbono e nitrogênio, e mesmo a diferentes sais utilizados nos meios de cultura para seu crescimento. O *Bt* pode ser cultivado usando meios alternativos ou subprodutos de indústria e da agricultura. Várias fontes de carbono a preços reduzidos podem ser usadas, tais como glucose de milho, melado de cana, melaço de beterraba e amido de alguns cereais. Como fonte de nitrogênio podem ser usadas as farinhas de soja, extrato de soja (que possui textura mais fina), levedura e água de maceração de milho. Entretanto, todo o material a ser utilizado deve ser esterilizado. A atividade tóxica do bioinseticida à base de *Bt* vai depender do meio utilizado e da cepa. Valicente et al. (2007a) testaram várias concentrações de carbono e nitrogênio para o crescimento de uma determinada cepa de *Bt*. Os melhores resultados foram obtidos quando foi utilizada uma concentração de nitrogênio três vezes maior que a de carbono. Atualmente, o dobro da concentração de carbono em relação ao nitrogênio tem sido adotado. Normalmente os principais fatores avaliados durante o crescimento de *Bt* são massa celular, unidades formadoras de colônia, esporos viáveis e mortalidade do inseto-alvo causada pelo *Bt*, sendo estes resultados variáveis de cepa para cepa.

O *Bt* pode ser produzido tanto em fermentação líquida como em meio sólido. No final da fase vegetativa, a exaustão dos nutrientes do meio de cultura induz o início da esporulação. Um fator determinante na produção de biopesticidas à base de *Bt* é a oxigenação do meio durante o processo de fermentação. Valicente e Zanasi (2005) inovaram o processo de fermentação em meio sólido utilizando 50 gramas de arroz como substrato para o crescimento do *Bt*. O arroz foi enriquecido com fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais e posteriormente foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos em sacos de polipropileno. Após a esterilização, o material foi inoculado com a cepa de *Bt* adequada previamente crescida em meio líquido, em ambiente estéril. Esta mistura foi mantida a 30 °C por quatro dias para completa esporulação. O biopesticida produzido deste modo é barato e fácil de ser aplicado. Após o período de quatro dias, o material deve ser congelado até o uso. Porém, toda

a estrutura e a produção devem obedecer às boas práticas de laboratório, incluindo a esterilização de todo o material a ser utilizado.

Resultados de pesquisa têm mostrado que o *Bt* pode ser produzido em meios alternativos, utilizando os resíduos da indústria e com materiais de baixo custo, porém todo o laboratório e o sistema de fermentação devem ser esterilizados. A grande vantagem destes sistemas de produção é que este biopesticida pode ser usado por pequenos, médios e grandes produtores rurais.

O que se tem visto hoje no Brasil é uma grande quantidade de pessoas tentando produzir biopesticida à base de *Bt* em sistema denominado “on farm” – em que a produção é realizada na propriedade rural. Mas com essa tentativa de “produção caseira” observa-se que as instalações não possuem o mínimo de assepsia necessária para manter um ambiente livre de microrganismos, que necessita de esterilização do meio de cultura, além da padronização de todo o sistema de produção, e do produto final. Para este sistema de produção, o que se tem observado é a utilização de diferentes fontes de inóculo de *Bt*, meios de cultura e condições de cultivo. Normalmente os bioinseticidas “on farm” são armazenados em tanques metálicos ou caixas d’água que não são adequados, pois possuem aberturas que facilitam a contaminação durante todo o processo. Se o processo de fermentação está em contato com contaminantes, este fator inviabiliza o uso do produto final na forma de pulverização, gerando inclusive mau cheiro. No caso de produção “on farm”, os perigos do crescimento de contaminantes são mais evidentes, uma vez que normalmente não são utilizados produtos esterilizados nem fermentadores adequados, e os contaminantes podem ser mais agressivos no crescimento do que o próprio *Bt*. Para verificar os microrganismos presentes, amostras de *Bt* produzidas em sistema “on farm” foram solicitadas a produtores rurais. Somente três amostras do Estado de Mato Grosso foram encaminhadas e analisadas usando microscopia de contraste de fase e sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal para identificação molecular dos microrganismos.

## Material e Métodos

### Amostragem

Amostras de *Bt* produzidas em sistema “on farm” foram coletadas em recipientes plásticos por três diferentes produtores rurais do Mato Grosso. As amostras foram congeladas até o processamento.

### Identificação Molecular de Microrganismos

#### Crescimento Bacteriano e Extração de DNA

As amostras de *Bt* “on farm” foram diluídas 1.000X em água ultrapura estéril e plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) contendo 1,5% (m/v) de ágar e cultivadas a 28 °C por dois dias. Para a extração de DNA bacteriano, 50 colônias isoladas foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura LB e crescidas a 28 °C por 24 h sob agitação de 150 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 16.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A extração de DNA genômico bacteriano foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1X (10 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA; pH 8,0), corado com solução de GelRed (Biotium, EUA). As amostras foram visualizadas em transiluminador sob luz UV e fotografadas no equipamento Gel Logic 200 (KODAK, EUA). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, EUA) e as amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng/μL.

#### Amplificação Parcial do Gene 16S *rRNA*

As reações de PCR foram preparadas com os primers 8F e 1492F para amplificação parcial da região 16S rDNA (Tabela 1). A amplificação do DNA foi realizada num volume final de 20 μl, contendo 30 ng de DNA; tampão de reação 1X (Kapa Biosystems, EUA); 125 μM de trifosfato de desoxinucleotídeos (dNTP); dimetilsulfóxido (DMSO) 4% (v/v); primers a 0,5 μM cada e 1U de Taq DNA Polimerase (Kapa Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) com uma desnaturação inicial

a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, por anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) por uma hora a 100 V em tampão TAE 1X. O gel foi corado com solução de Gel Red (Biotium, EUA), visualizado sob luz UV e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (KODAK, EUA).

**Tabela 1.** Primers utilizados na amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Primer	Sequência (5'- 3')	Referência
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Turner et al. (1999)
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Turner et al. (1999)
515F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	Turner et al. (1999)
902R	GTC AAT TCI TTT GAG TTT YAR YC	Hodkinson e Lutzoni (2009)

<sup>Y</sup>: representa as bases nitrogenadas citosina ou timina.

<sup>M</sup>: representa as bases nitrogenadas adenina ou citosina.

<sup>R</sup>: representa as bases nitrogenadas adenina ou guanina.

<sup>I</sup>: representa a base inosina, que pode parear com qualquer nucleotídeo.

## Sequenciamento de DNA

Para a purificação dos fragmentos de DNA amplificados, foram adicionados 4 µL da enzima Exo-Sap (GE HealthCare, EUA) em 15 µL produto da reação de PCR. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e a 80 °C por 15 minutos. As reações de sequenciamento foram elaboradas com 4 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de primers 8F ou 902R a 10 µM (Tabela 1), 0,5 µL Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, EUA), 1,75 µL do tampão de sequenciamento (Applied Biosystems, EUA) e 2,75 µL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador a 96 °C por 1 minuto, 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes. Após o término da reação, foram adicionados 60 µL de etanol absoluto mais 5 µL de EDTA (125 mM). Em seguida, os microtubos foram homogeneizados e incubados no escuro em temperatura ambiente por

15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos e o etanol foi descartado. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65 °C por 3 minutos, ressuspensas com 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA) e desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. As amostras de DNA bacteriano foram analisadas no sequenciador de DNA modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA) e as sequências foram alinhadas utilizando o programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, EUA). Os microrganismos presentes nas amostras de *Bt* com produção “on farm” foram identificados por comparação de sequências contra o banco de dados público de sequências de DNA do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) com o programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

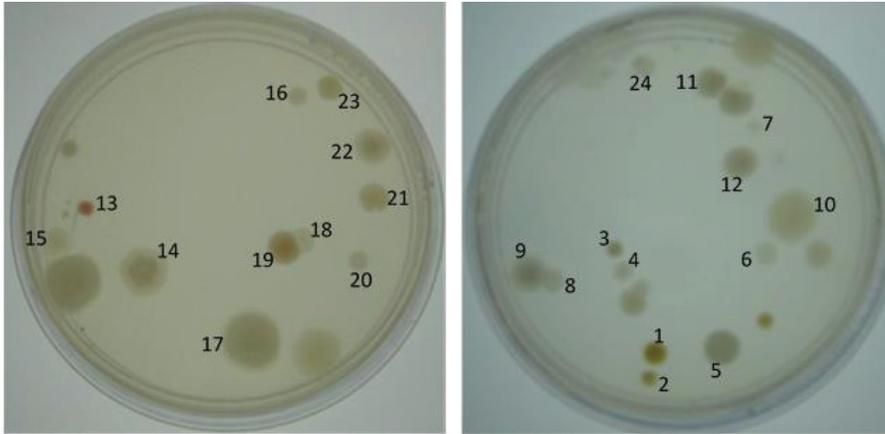
## Microscopia de Contraste de Fase

Algumas colônias observadas nas amostras de *Bt* “on farm” foram avaliadas por microscopia em contraste de fase com aumento de 400X. Como controle, foi incluída para comparação uma amostra de *Bt* da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo.

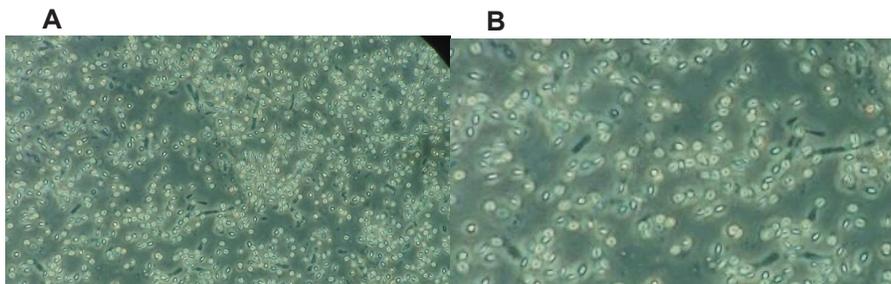
## Resultados e Discussão

O plaqueamento das amostras de biopesticida à base de *Bt* produzidas em sistema “on farm” em propriedades rurais do Mato Grosso mostrou vários tipos de colônias com diferentes aspectos e cores, muitas delas sem qualquer semelhança com a morfologia das colônias de *Bt* em meio de cultura sólido (Figura 2).

Algumas dessas colônias obtidas das amostras de *Bt* “on farm” foram observadas em microscopia de contraste de fase. Na maioria das amostras não foram observados esporos ou cristais que são característicos da espécie *Bt* (Figura 3). Além disso, os esporos, quando observados, mostraram formatos completamente diferentes dos esporos que são vistos em amostras de *Bt*.

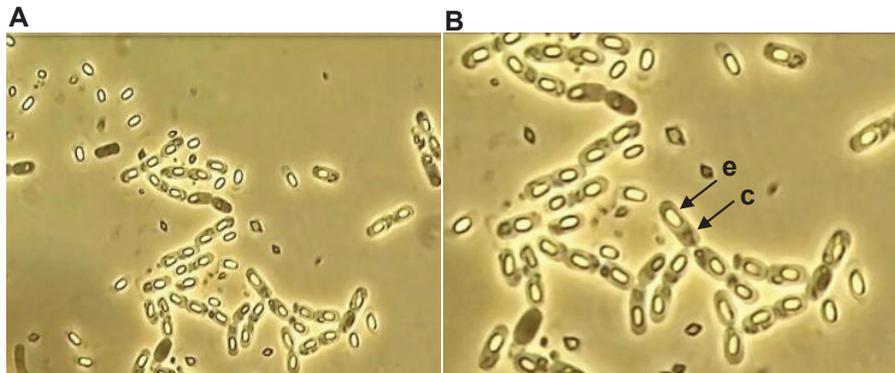


**Figura 2.** Aspecto de algumas colônias bacterianas presentes em amostra de *Bt* produzido “on farm” após diluição de 1.000 X e plaqueamento em meio LB.



**Figura 3.** Imagem de microscopia de contraste de fase de uma bactéria contaminante presente em amostra de *Bacillus thuringiensis* produzido “on farm”. **(A)** Imagem com aumento de 400X. **(B)** Imagem com aumento de 400X com zoom por programa de computador.

Uma amostra de *Bt* pertencente ao banco de microrganismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo foi incluída como controle, e foi possível observar tanto a presença de cristais como de esporos, típicos dessa espécie (Figura 4).



**Figura 4.** Imagem de microscopia de contraste de fase de um isolado de *Bacillus thuringiensis*. **(A)** Imagem com aumento de 400X. **(B)** Imagem com aumento de 400X com zoom por programa de computador. As setas indicam o cristal (c) e o esporo (e).

Para a identificação molecular das bactérias presentes nas amostras de biopesticida *Bt* produzidas “on farm”, o DNA bacteriano de 50 colônias obtidas após plaqueamento das amostras em meio de cultura sólido (Figura 1) foi isolado e amplificado com primers para amplificação da região 16S rDNA. O sequenciamento do DNA revelou a presença de diversas espécies bacterianas, indicando que o processo de fermentação para produção do bioinseticida *Bt* ocorreu sem as mínimas condições de asepsia e esterilização. Para minimizar erros, a identificação molecular foi baseada na similaridade das sequências de DNA obtidas com outras sequências descritas em trabalhos científicos já publicados (Tabela 2). Apenas as colônias 29, 34 e 35 foram confirmadas como pertencentes à espécie *B. thuringiensis*. Entretanto, mesmo sendo *Bt*, são necessários alguns cuidados pois algumas cepas podem sintetizar  $\beta$ -exotoxina, uma proteína produzida durante a fase vegetativa da célula e secretada no meio de cultura. Ela é termolábil, com baixa massa molecular, e apresenta amplo espectro de toxicidade para várias ordens de insetos, ácaros, nematoides e vertebrados, provocando efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen; Salamitou, 2000). Por causa da alta toxicidade em mamíferos, um dos critérios indispensáveis para a produção de bioinseticida à base de *Bt* consiste na seleção de cepas que não produzem  $\beta$ -exotoxina (Mcclintock et al., 1995).

A análise das sequências de DNA indicou que 24% das amostras foram pertencentes ao *Bacillus* sp., sem atribuição da espécie. O gênero *Bacillus* é

muito amplo e compreende 268 espécies e 7 subespécies, incluindo várias espécies patogênicas para humanos e animais (Reino Unido, 2015). Os isolados 26, 27, 28, 32 e 33 foram identificados como *B. cereus*, uma espécie relatada como patógeno oportunista humano e ocasionalmente associado a infecções, causando doenças periodontais e outras infecções mais graves (Hoffmaster et al., 2006). Pacientes imunocomprometidos são suscetíveis a bacteremia, endocardite, meningite, pneumonia e endoftalmite causados por esta espécie (Wijnands et al., 2006).

Vários outros gêneros de microrganismos encontrados no biopesticida “on farm” também podem apresentar riscos para mamíferos. Entre elas, podemos destacar a presença de um isolado do gênero *Microbacterium*, frequentemente encontrado em isolados clínicos humanos (Funke et al., 1995), sendo algumas espécies resistentes a múltiplos antibióticos (Sharma et al., 2013). A prevalência de *Enterococcus casseliflavus* (isolado 23) e *E. gallinarum* (isolados 04, 06, 08, 16, 17, 20 e 24) mostra-se preocupante, uma vez que estas espécies têm sido associadas à endocardite (Dargere et al., 2002) e meningite em humanos (Iaria et al., 2005; Antonello et al., 2010).

Assim, apesar da frequente utilização de produtos comerciais à base de *Bt* comercial como fonte de inóculo no sistema de produção “on farm”, esses resultados indicam que os contaminantes foram agressivos no crescimento nos meios de cultura. As amostras de *Bt* produzidas “on farm” não foram testadas quanto à eficiência no controle da lagarta-do-cartucho, em função do risco dos patógenos identificados.

**Tabela 2.** Identificação molecular baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de bactérias presentes em amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzido em sistema “on farm” em propriedades rurais do Estado do Mato Grosso.

Colônia	Tamanho (pb) <sup>a</sup>	Espécie	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	GenBank	Referência	Patogenicidade em mamíferos
01	729	<i>Microbacterium</i> sp.	100	0.0	99	EU438940.1	Suihko e Skytta (2009)	Sim
02	760	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	100	0.0	100	EU438976.1	Suihko e Skytta (2009)	Não
03	829	<i>Bacillus</i> sp.	99	0.0	97	AJ438295.1	De Clerck et al. (2002)	Depende da espécie
04	775	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100	0.0	100	KF254553.1	Maleki-Ravasan et al. (2015)	Sim
05	819	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	0.0	99	JQ726631.1	Pereira et al. (2013)	Depende da espécie
06	801	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100	0.0	99	KF254553.1	Maleki-Ravasan et al. (2015)	Sim
07	806	<i>Bacillus</i> sp.	99	0.0	99	AM910313	Coorevits et al. (2008)	Depende da espécie
08	826	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100	0.0	99	KF254553.1	Maleki-Ravasan et al. (2015)	Sim
09	828	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	0.0	100	HM359119.1	Bisht e Panda (2011)	Não
10	792	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	0.0	99	FR727702.1	Caliz et al. (2011)	Não
11	726	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	100	0.0	99	JX429820.1	Basu et al. (2013)	Não
12	784	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	0.0	100	HM359119.1	Bisht e Panda (2011)	Não
13	753	<i>Methylobacterium populi</i>	100	0.0	99	AP014809.1	Morohoshi e Ikeda (2016)	Não
14	773	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	0.0	100	HM359119.1	Bisht e Panda (2011)	Não
15	819	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	AM910313	Coorevits et al. (2008)	Depende da espécie
16	794	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100	0.0	100	HQ293088.1	Nawaz et al. (2011)	Sim
17	946	<i>Enterococcus gallinarum</i>	95	0.0	96	EF025905.1	Fonty et al. (2007)	Sim
18	757	<i>Enterococcus</i> sp.	100	0.0	100	JQ680268.1	Van den Bogert (2013)	Sim
19	719	<i>Microbacterium</i> sp.	100	0.0	99	DQ447770.1	Osman et al. (2007)	Depende da espécie
20	824	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100	0.0	100	HQ293088.1	Nawaz et al. (2011)	Sim
21	819	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	JQ415992.1	Vardhan et al. (2013)	Depende da espécie
22	800	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	0.0	99	HM359119.1	Bisht e Panda (2011)	Não
23	961	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	85	0.0	95	AB699730.1	Chen et al. (2013)	Sim
24	836	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100	0.0	100	KF254553.1	Maleki-Ravasan et al. (2015)	Sim
25	447	<i>Bacillus</i> sp.	96	0.0	93	JQ660692.1	Pathma e Sakthivel (2013)	Depende da espécie
26	833	<i>B. cereus</i>	100	0.0	99	MG214520.1	Egea et al. (2017)	Sim

<sup>a</sup>pb: Fragmento de DNA sequenciado em pares de bases.

...: Dados perdidos.

**Tabela 2 cont.** Identificação molecular baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de bactérias presentes em amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzido em sistema “on farm” em propriedades rurais do Estado do Mato Grosso.

Colônia	Tamanho (pb)*	Espécie	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	GenBank	Referência	Patogenicidade em mamíferos
27	859	<i>B. cereus</i>	99	0.0	99	MG561366.1	Rocha et al. (2017)	Sim
28	800	<i>B. cereus</i>	100	0.0	99	MG214520.1	Egea et al. (2017)	Sim
29	680	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	MG654637.1	Ari (2017)	Depende da cepa
30	821	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	JX315309.1	Peng et al. (2013)	Depende da espécie
31	293	<i>Bacillus</i> sp.	100	2e <sup>-148</sup>	99	KX369290.1	Leon-Palmero et al. (2018)	Depende da espécie
32	801	<i>B. cereus</i>	100	0.0	100	JK660691.1	Pathma e Sakthivel (2013)	Sim
33	814	<i>B. cereus</i>	99	0.0	99	MG214520.1	Egea et al. (2017)	Sim
34	784	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	MG654637.1	Ari (2017)	Depende da cepa
35	866	<i>B. thuringiensis</i>	96	0.0	99	MG654637.1	Ari (2017)	Depende da cepa
36	803	<i>B. cereus</i>	100	0.0	99	MG214520.1	Egea et al. (2017)	Sim
37	816	<i>B. cereus</i>	100	0.0	99	MG561366.1	Rocha et al. (2017)	Sim
38	800	<i>B. cereus</i>	100	0.0	99	FJ608120.1	Rani et al. (2009)	Sim
39	356	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	0.0	100	MF092806.1	Khan e Fulekar (2016)	Não
40	802	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	0.0	99	KJ123715.1	Li et al. (2014)	Não
41	353	<i>B. methylotrophicus</i>	100	2e <sup>-176</sup>	99	KT021487.1	Ezsookoli et al. (2016)	Não
42	721	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99	0.0	99	CP011252.1	Zhi et al. (2017)	Não
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	818	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	CP013950.1	Paludo et al. (2016)	Depende da espécie
45	799	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	CP013950.1	Paludo et al. (2016)	Depende da espécie
46	811	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	100	CP013950.1	Paludo et al. (2016)	Depende da espécie
47	779	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	JN132107.1	Tuo et al. (2012)	Depende da espécie
48	803	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	0.0	99	AB325582.1	Meerak et al. (2007)	Não
49	807	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	CP013950.1	Paludo et al. (2016)	Depende da espécie
50	-	-	-	-	-	-	-	-

\*pb: Fragmento de DNA sequenciado em pares de bases.

-: Dados perdidos.

## Conclusões

As amostras de *Bt* produzidas em sistema “on farm” em propriedades rurais no Mato Grosso apresentam-se contaminadas por diferentes espécies de bactérias. O produto mostra-se inadequado para uso como biopesticida e apresenta risco de contaminação para humanos e animais.

## Referências

ANTONELLO, V. S.; ZENKNER, F. de M.; FRANCA, J.; SANTOS, B. R. *Enterococcus gallinarum* meningitis in an immunocompetent host: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111-112, 2010.

ARI, W. L. M. Screening and characterization of keratinolytic bacteria from puffer fish skin waste. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 16, n. 7, p. 488-496, 2017.

BASU, S.; DEOBAGKAR, D. D.; MATONDKAR, S. P.; FURTADO, I. Culturable bacterial flora associated with the dinoflagellate green *Noctiluca miliaris* during active and declining bloom phases in the northern arabian sea. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 934-954, 2013.

BISHT, S. S.; PANDA, A. K. Biochemical characterization and 16S rRNA sequencing of few lipase-producing thermophilic bacteria from taptapani hot water spring, Orissa, India. **Biotechnology Research International**, 452710, Apr. 2011.

CALIZ, J.; VILA, X.; MARTI, E.; SIERRA, J.; CRUANAS, R.; GARAU, M. A.; MONTSERRAT, G. Impact of chlorophenols on microbiota of an unpolluted acidic soil: microbial resistance and biodegradation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 150-164, 2011.

CHEN, Y. S.; WU, H. C.; WANG, C. M.; LIN, C. C.; CHEN, Y. T.; JHONG, Y. J.; YANAGIDA, F. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from pobuzihi (fermented cummingcordia), a traditional fermented food in Taiwan. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 2, p. 103-109, 2013.

COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYRMAN, J.; MESSENS, W.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 126-140, 2008.

CRICKMORE et al. 2018. [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)

DARGERÉ, S.; VERGNAUD, M.; VERDON, R.; SALOUX, E.; LE PAGE, O.; LECLERCQ, R.; BAZIN, C. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2308-2310, 2002.

DE CLERCK, E.; DE VOS, P. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endospore forming genera. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 611-617, 2002.

EGEA, T. C.; SILVA, R. da; BOSCOLO, M.; RIGONATO, J.; MONTEIRO, D. A.; GRUNIG, D.; SILVA, H. da; VAN DER WIELEN, F.; HELMUS, R.; PARSONS, J. R.; GOMES, E. Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. **Heliyon**, v. 3, n. 12, 00471, 2017.

EZEOKOLI, O.; GUPTA, A.; POPOOLA, T.; BEZUIDENHOUT, C. Molecular analysis of bacterial community dynamics during the fermentation of soy-daddawa condiment. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 1081-1086, 2016.

FONTY, G.; JOBLIN, K.; CHAVAROT, M.; ROUX, R.; NAYLOR, G.; MICHALLON, F. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6391-6403, 2007.

FUNKE, G.; FALSEN, E.; BARREAU, C. Primary identification of *Microbacterium* spp. encountered in clinical specimens as CDC coryneform group A-4 and A-5 bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 188-192, 1995.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.).

**Entomopathogenic bacteria:** from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-44.

HODKINSON, B. P.; LUTZONI, F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis**, v. 49, n. 3, p. 163-180, 2009.

HOFFMASTER, A.; HILL, K.; GEE, J.; MARSTON, C.; DE, B.; POPOVIC, T.; SUE, D.; WILKINS, P.; AVASHIA, S.; DRUMGOOLE, R.; HELMA, C.; TICKNOR, L.; OKINAKA, R.; JACKSON, P. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* virulence. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3352-3360, 2006.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

IARIA, C.; STASSI, G.; COSTA, G. B.; DI LEO, R.; TOSCANA, A.; CASCIO, A. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, jan. 2005. 3 p.

KHAN, R.; FULEKAR, M. H. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* culture and enhancement of its photocatalytic activity for the degradation of a sulfonated textile dye Reactive Red 31. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 475, p. 184-191, 2016.

LEON-PALMERO, E.; JOGLAR, V.; ALVAREZ, P. A.; MARTIN-PLATERO, A.; LLAMAS, I.; RECHE, I. Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. **PLoS One**, v. 13, n. 5, e0196178, doi: 10.1371/journal.pone.0196178

LI, P.; LI, S.; CHENG, L.; LUO, L. Analyzing the relation between the microbial diversity of DaQu and the turbidity spoilage of traditional Chinese vinegar. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 6073-6084, 2014.

MALEKI-RAVASAN, N.; OSHAGHI, M.; AFSHAR, D.; ARANDIAN, M.; HAJIKHANI, S.; AKHAVAN, A.; YAKHCHALI, B.; SHIRAZI, M.; JAFARI, R.; AMINIAN, K.; FAZELI-VARZANEH, R.; DURVASULA, R.; RASSI, Y. Aerobic bacterial flora of biotic and abiotic compartments of a hyperendemic Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) focus. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 63, 2015.

Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-014-0517-3>>.

MCCLINTOCK, J. T.; SCHAFFER, C. R.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* – based pesticides. **Journal of Pest Science**, v. 45, n. 2, p. 95-105, 1995.

MEERAK, J.; IIDA, H.; WATANABE, Y.; MIYASHITA, M.; SATO, H.; NAKAGAWA, Y.; TAHARA, Y. Phylogeny of gamma-polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented soybean foods manufactured in Asian countries. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 315-323, 2007.

MOROHOSHI, T.; IKEDA, T. Complete genome sequence of *Methylobacterium populi* P-1M, isolated from pink-pigmented household biofilm. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, e00458-16, 2016.

NAWAZ, M.; WANG, J.; ZHOU, A.; MA, C.; WU, X.; MOORE, J. E.; MILLAR, B. C.; XU, J. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic Acid bacteria from fermented food products. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1081-1089, 2011.

OSMAN, S.; MOISSE, C.; HOSOYA, N.; BRIEGEL, A.; MAYILRAJ, S.; SATOMI, M.; VENKATESWARAN, K. *Tetrasphaera remsis* sp. nov., isolated from the Regenerative Enclosed Life Support Module Simulator (REMS) air system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2749-2753, 2007.

PALUDO, C. R.; RUZZINI, A. C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; PISHCHANY, G., CURRIE, C. R.; NASCIMENTO, F. S.; KOLTER, R. G.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Whole-genome sequence of *Bacillus* sp. SDLI1, isolated from the social bee *Scaptotrigona depilis*. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, e00174-16, 2016.

PATHMA, J.; SAKTHIVEL, N. Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 33-47, 2013.

PENG, J.; ZHANG, X.; XU, X.; HE, F.; QI, S. Diversity and chemical defense role of culturable non-actinobacterial bacteria isolated from the South china

sea gorgonians. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 437-443, 2013.

PEREIRA, G. V. de M.; MAGALHAES, K. T.; ALMEIDA, E. G. de; COELHO, I. da S.; SCHWAN, R. F. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 121-133, 2013. Entrada era DE MELO PEREIRA

RANI, A.; SHARMA, A.; RAJAGOPAL, R.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R. K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 96, 2009.

REINO UNIDO. Public Health England. **UK Standards for Microbiology Investigations**: identification of *Bacillus* species. London, 2018. 27 p. (ID 9, n. 3.1). Disponível em: <[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/697260/ID\\_9i3.1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/697260/ID_9i3.1.pdf)>.

<[www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories](http://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories)>. Public Health England

ROCHA, F. Y. O.; OLIVEIRA, C. M. de; SILVA, P. R. A. da; MELO, L. H. V. de; DO CARMO, M. G. F.; BALDANI, J. I. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Applied Soil Ecology**, v. 120, p. 8-19, 2017.

SHARMA, P.; DIENE, S. M.; THIBEAUT, S.; BITTAR, F., ROUX, V.; GOMEZ, C., REYNAUD-GAUBERT, M.; ROLAIN, J. M. Phenotypic and genotypic properties of *Microbacterium yannicii*, a recently described multidrug resistant bacterium isolated from a lung transplanted patient with cystic fibrosis in France. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 97, 2013.

SUIHKO, M. L.; SKYTТА, E. Characterisation of aerobically grown non-spore-forming bacteria from paper mill pulps containing recycled fibres. **Microbial Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 53-64, 2009.

TUO, B. H.; YAN, J. B.; FAN, B. A.; YANG, Z. H.; LIU, J. Z. Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 55-60, 2012.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

VAN DEN BOGERT, B.; ERKUS, O.; BOEKHORST, J.; GOFFAU, M.; SMID, E. J.; ZOETENDAL, E. G.; KLEEREBEZEM, M. Diversity of human small intestinal *Streptococcus* and *Veillonella* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 85, n. 2, p. 376-388, 2013.

VARDHAN, S.; YADAV, A. K.; PANDEY, A. K.; ARORA, D. K. Diversity analysis of biocontrol *Bacillus* isolated from rhizospheric soil of rice-wheat (*Oryza sativa-Triticum aestivum* L.) at India. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 5, p. 485-490, 2013.

WIJNANDS, L.; DUFRENNE, J.; ZWIETERING, M. H.; LEUSDEN, F. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 120-128, 2006.

ZHI, Y.; WU, Q.; XU, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40976, 2017.

Esta publicação está disponível no endereço:  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

**1ª edição**

*Formato digital (2018)*

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Sidney Netto Parentoni*

Secretário-Executivo

*Elena Charlotte Landau*

Membros

Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria  
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira  
Simeone, Roberto dos Santos Trindade e  
Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto

*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica

*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações

*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Tânia Mara Assunção Barbosa*



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

Governo  
Federal