

# ESTUDO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE TOXINA CRY POR BACTÉRIA ISOLADA DE SOLO. I - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH E DO TAMPÃO DE ATIVAÇÃO.

João P.L. **Tozzi**<sup>1</sup>, Luciana A. **Avila**<sup>2</sup>, Deise M. F. **Capalbo**<sup>3</sup>, Itamar S. de **Melo**<sup>3</sup>, Olívia **Arantes**<sup>4</sup>

Nº 0207005

## Resumo

Microrganismos da rizosfera sofrem influência direta de exsudados de raízes das plantas. Plantas transgênicas podem exsudar novas proteínas produzidas a partir de respostas de genes instalados nessas plantas, o que poderia gerar impactos à microbiota do solo. Este trabalho teve por objetivo avaliar a dinâmica de crescimento de um microrganismo isolado em meio mínimo, a partir de solo rizosférico de algodão Bt, em dois pH e na presença e ausência de tampão carbonato (tampão de ativação). Estas respostas são essenciais para a etapa futura do trabalho de estudo da degradação da proteína Cry. O crescimento foi realizado em meio mínimo líquido mineral, a pH 7,0 e 8,0 na presença e ausência de tampão ativador da proteína, a 180 rpm, 28° C por 72 horas. Verificou-se o crescimento bacteriano, em nutriente ágar, após 48 horas de incubação a 28° C, sendo expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Observou-se que não houve diferença significativa entre os crescimentos a diferentes pH e na presença ou ausência do tampão.

## Introdução

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria aeróbia facultativa, móvel, Gram-positiva, que pode ser encontrada em solos, insetos, produtos estocados, no interior de plantas (endofítica) e vários outros locais. Durante a fase de esporulação forma uma inclusão cristalina, constituída por polipeptídeos, denominada δ-endotoxina ou proteína cristal (Cry) estocada na forma de corpúsculos ou paraesporos (HANNAY & FITZ-JAMES, 1955; DEAN, 1984). Estirpes de Bt têm apresentado patogenicidade contra larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros, devido à endotoxina (MONNERAT; BRAVO, 2000).

A proteína cristal, quando sintetizada pelo Bt, apresenta-se na forma não tóxica (inativa). Ela é solubilizada e proteoliticamente convertida em polipeptídios menores no trato digestivo das larvas suscetíveis. A ativação da proteína ocorre, portanto, quando uma larva de inseto susceptível é capaz de solubilizar o cristal em seu intestino, e isso ocorre se o pH for alcalino (SCHNEPF *et al.*, 1998).

---

1- Bolsista CNPq – Graduação em Ciências Biológicas PUC-Campinas [jptozzi@gmail.com](mailto:jptozzi@gmail.com)

2- Aluna de mestrado – USP

3- Pesquisador Embrapa Meio Ambiente

4- Colaborador: Pesquisador Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR

Com o advento das plantas geneticamente modificadas, a expressão de endotoxinas de Bt em plantas teve seu primeiro resultado de sucesso em 1987, quando foram produzidas plantas transgênicas Bt de fumo (VAECK *et al.*, 1987; BARTON *et al.*, 1987). Outras plantas se seguiram a este evento, e hoje, no Brasil, está autorizado o plantio comercial de algodão Bt, estando em análise na CTNBio, outros eventos de algodão e plantas como o milho Bt.

As plantas são conhecidas por excretarem materiais orgânicos no solo que por sua vez influenciam os microrganismos da rizosfera. A quantidade e composição dos exudados estão relacionados com o ciclo da planta, espécie, idade e região da raiz (FELSKE, *et al.* 1997; MALONEY, *et al.*, 1997).

Inúmeros trabalhos relatam a importância dos microrganismos benéficos da rizosfera na manutenção da sustentabilidade do agrossistema e seus benefícios à planta com a qual se associam. Dentre estes microrganismos encontram-se as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), caracterizadas por colonizar ativamente as raízes e aumentar o crescimento da planta (KLOPPER *et al.*, 1980). Essas rizobactérias têm sido aplicadas em extensas áreas de plantio com o propósito de controle de doenças e aumento do crescimento (VALARINI *et al.*, 2003).

Este trabalho está inserido em um estudo maior, de detecção da degradação de proteína Cry exsudada de plantas Bt por microrganismos do solo, e seu destino. Assim, nesta etapa do trabalho foi verificado se a presença do tampão carbonato-bicarbonato de sódio, utilizado como veículo para testes da toxina purificada, pode influir no crescimento da bactéria selecionada.

O objetivo do estudo foi definir dinâmica de crescimento da bactéria previamente isolada em meio mínimo, a partir de solo rizosférico de cultivo do algodão transgênico (elevado potencial de biodegradação da proteína Cry1Ac, presente no algodão Bt Bollgard I<sup>®</sup> autorizado para plantio comercial no Brasil). Conhecida a influência dos fatores pH (fator de ativação da toxina no ambiente) e tampão carbonato (veículo de solubilização da toxina Cry em ensaios bioquímicos e toxicológicos futuros), testes quantitativos de determinação de degradação da toxina Cry poderão ser realizados.

## **Material e método**

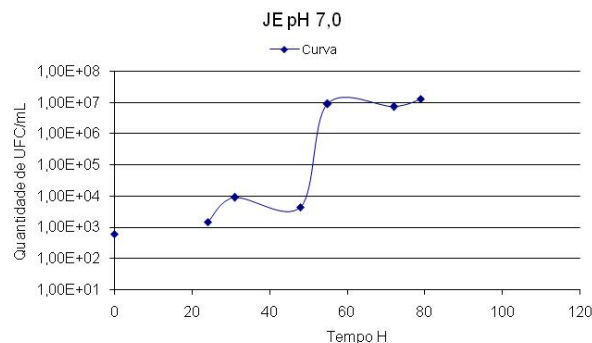
Em estudos anteriores foi isolada, e selecionada por seu potencial de crescimento, uma bactéria de amostras de solo de cultivo do algodoeiro, denominada no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente como Bt 6Ae raiz I (em análise para caracterização e definição da espécie). Dado seu potencial de degradação da proteína Cry (resultados preliminares realizados no LMA), teve sua dinâmica de crescimento determinada em meio mínimo mineral JE (Jones & Edington) em dois pH (7,0 e 8,0), na presença e na ausência de tampão carbonato – bicarbonato de sódio. Como mencionado anteriormente o pH é fator importante para ativação da proteína tóxica a insetos; e a presença do tampão carbonato (veículo indispensável para manipulação da toxina ativa) pode ser

fator que interfira no crescimento da bactéria, camuflando, nos estudos futuros, a degradação da toxina que será estudada.

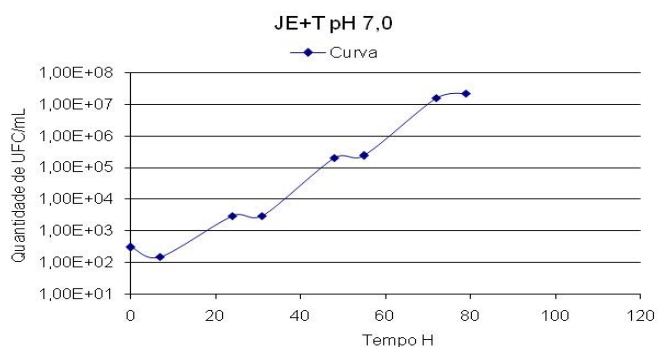
O crescimento para estes estudos foi realizado em erlenmeyer com meio mínimo mineral JE com tampão e sem tampão a pH 7,0 e 8,0 nos dois casos, durante 72 horas com agitação de 180 rpm a 28° C. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada após plaqueamento seriado de alíquotas de 100 µL em placas de petri com meio nutriente agar. As determinações foram realizadas nos tempos: 0, 7, 24, 31, 48, 55, 72 horas de crescimento. As placas foram incubadas em estufas a 28° C por 48 horas para posterior contagem.

## Resultados e discussão

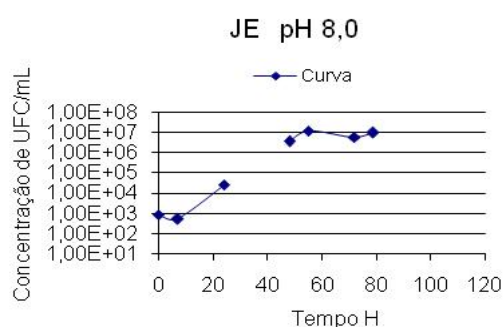
O crescimento bacteriano (expresso em UFC/mL) não sofreu interferência estatisticamente significativa pela presença ou ausência do tampão. Também se pode observar nas figuras 1, 2, 3 e 4, que não houve diferença significativa quando o pH foi alterado de 7 para 8. Em todos os casos o nível inicial de células foi da ordem de  $10^3$  UFC/mL e o final foi de  $10^7$



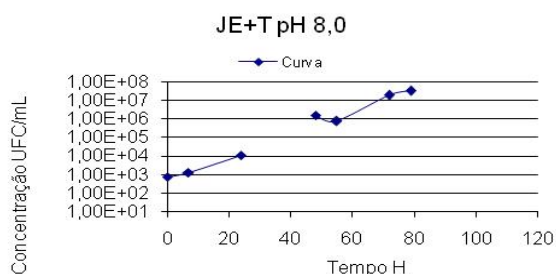
**FIGURA 1. Crescimento microbiano (UFC/mL) em função do tempo (hora); condições: meio JE, pH 7,0, sem tampão carbonato.**



**FIGURA 2. FIGURA 1. Crescimento microbiano (UFC/mL) em função do tempo (hora); condições: meio JE, pH 7,0, com tampão carbonato**



**FIGURA 3. FIGURA 1. Crescimento microbiano (UFC/mL) em função do tempo (hora); condições: meio JE, pH 8,0, sem tampão carbonato**



**FIGURA 4. FIGURA 1. Crescimento microbiano (UFC/mL) em função do tempo (hora); condições: meio JE, pH 8,0, com tampão carbonato**

Frente aos resultados obtidos, as etapas seguintes de estudos da degradação da toxina Cry, podem ser realizados com o uso do tampão carbonato em pH 7 ou 8 indistintamente, sem que haja interferência no crescimento bacteriano por estes fatores. O estudo da degradação da proteína Cry por esta e outras bactérias será feito, então, neste meio mínimo acrescido da proteína e os peptídeos formados na degradação serão identificados em espectrometria de massa.

Este dado será importante também na determinação do protocolo de detecção, visto que a o tampão utilizado neste estudo será o mesmo porposto para ativação da proteína nos protocolos propostos para estudos da toxicidade da proteína a insetos, nas etapas futuras do projeto no qual esta bolsa se insere.

## Referências Bibliográficas

BARTON, K.A.; WHITELEY, H.R.; YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v.85, p.1103-1109, 1987.

BAUMANN, H.; CAO, K.; HOWALD, H. Improved resolution with one-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis: myofibrillar proteins from typed single fibers of human muscle. **Anal Biochem**. v.137, p. 517–522, 1984.

BRUINSMA, M.; KOWALCHUK, G.A., VAN VEEN, J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Bio Fertil Soils**, v. 37, p. 329-337, 2003.

DEAN, D.H. Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnol. Genet. Eng. Ver.**v.2, p.341-363, 1984.

FELSKE, A., RHEIMS, H.; WOLTERINK, A.; STACKEBRANDT, E.; AKKERMANS A. D. L. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. **Microbiology**, v.143, p.2983-2989, 1997.

HANNAY, C.L.; FITZ-JAMES, P.C. The protein-crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Can. J. Microbiol.** v.1, p. 694-710, 1955.

KANEKO, I.; HAZAMA-SHIMADA, Y.; ENDO, A. Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. **Eur. J. Biochem.** v. 87, p. 313–321, 1978.

KLOEPPER, J.W; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophore produced by plant growth-promotion rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p.885-886, 1980.

KLOEPPER, J.W; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophore produced by plant growth-promotion rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p.885-886, 1980.

LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API system, **J. Gen. Microbiol.** v. 130, p.1871-1882, 1984.

MALONEY, P. E.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; HU, S. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizosphere and in bulk soil. **Microb. Ecol.** V. 34, p.109-117, 1997.

MALONEY, P. E.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; HU, S. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizosphere and in bulk soil. **Microb. Ecol.** V. 34, p.109-117, 1997.

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

SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Rev.** v.62, n.3, p.775-780, 1998.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; DEBEUCKELLER, M.; DEAN, C.; ZABEU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v.328, p.33-37, 1987.

VALARINI, P.J.; MELO, I.S.; MORSOLETTI, R.V. Controle alternativo da podridão radicular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**. v. 29, n.4, 2003.