

JOÃO PAULO LEITE TOZZI

Degradação da proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* por bactérias de solo de cultura do algodão transgênico e convencional (*Gossypium hirsutum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

SÃO PAULO
2009

RESUMO

TOZZI, J.P.L. **Degradação da proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* por bactérias de solo de cultura do algodão transgênico e convencional (*Gossypium hirsutum*)**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São de Paulo, São Paulo, 2009.

Bacillus thuringiensis (Bt), é uma bactéria utilizada como biopesticida, com capacidade de esporular e formar cristais protéicos contendo a proteína Cry1Ac, tóxica a larvas de lepidópteros. As plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos expressam essa mesma toxina. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e identificação de bactérias do solo e da rizosfera presentes na cultura de algodão transgênico e não transgênico com potencial ação biodegradadora da proteína Cry1Ac. Para tais bactérias foram estudadas a dinâmica de seu crescimento em meios enriquecidos com a proteína Cry1Ac ou glucose, a detecção da possível biodegradação, e a presença de três tipos de genes (*apr*, *npr* e *sub*) geralmente indicados como responsáveis pela produção de proteases. Em solo de algodoeiro convencional e na região rizosférica dessas mesmas plantas, as médias foram de $4,24 \times 10^5$ e $5,15 \times 10^5$ UFCs de bactérias/g de solo respectivamente; para algodão transgênico as médias foram $6,21 \times 10^8$ UFCs/g de solo rizosférico e 4×10^6 UFCs/g no solo não rizosférico. Nos estudos preliminares de potencial de biodegradação da proteína Cry1Ac seis bactérias se destacaram e foram identificadas: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis canadensis*, *Bacillus pumilus*, *Sphingobacterium multivorum*, *Gordonia rubripertincta*. A taxa de crescimento da bactéria *B. pumilus* foi maior em meio contendo a proteína Cry1Ac que com glucose sendo que a bactéria *G. rubripertincta* em meio de cultivo mineral contendo glucose teve uma taxa de crescimento maior do que contendo a proteína Cry1Ac. Foi verificada a biodegradação da proteína Cry1Ac pelas bactérias *B. pumilus* e *G. rubripertincta* durante o cultivo em meio mínimo mineral contendo a proteína Cry1Ac por meio de gel SDS-PAGE e seqüenciamento por espectrometria de massas. Os genes responsáveis pela expressão das proteases extracelulares *apr* e *sub* foram detectados em solo cultivado com planta transgênica divergindo do gene *npr* que não foi detectado em solo cultivado com o algodão transgênico e também com o convencional, apenas em DNA da bactéria *Bacillus pumilus* que foi usado como controle positivo.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus pumilus*. Proteína Cry1Ac. Algodão transgênico. Biodegradação.

ABSTRAT

TOZZI, J.P.L. **Degradation of Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* by soil bacteria from transgenic and conventional cotton (*Gossypium hirsutum*) culture.** 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São de Paulo, São Paulo, 2009.

Bacillus thuringiensis (Bt) is a bacterium used as a biopesticide with the ability to form crystals of the Cry1Ac protein, which is toxic to larvae of Lepidoptera. Genetically modified plants resistant against insects express this toxin, which is also released in the rhizosphere and soil. This study aimed the isolation and identification of bacteria from transgenic cotton soil and rhizosphere which are able biodegrade the Cry1Ac protein. Also, the dynamics of growth of these bacteria were evaluated in enriched media with the Cry1Ac protein or glucose. Moreover, the detection of the genes involved with the toxin degradation (the proteases codifying-genes *apr*, *npr* and *sub*) was made in soils samples from distinct cultivation fields. Results have first shown the distinct density of culturable bacteria in soil and rhizosphere of transgenic plants, with values of 4.24×10^5 and 5.15×10^5 CFU of bacteria / g of soil and rhizosphere, respectively. Also, a higher density was found in transgenic plants, 4×10^6 CFU / g and 6.21×10^8 CFU / g of soil and rhizosphere, respectively. From these bacteria, six isolates were selected due to the ability in degrading the Cry1Ac protein, identified as *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis canadensis*, *Bacillus pumilus*, *Sphingobacterium multivorum*, *Gordonia rubripertincta*. It was verified the degradation of the Cry1Ac protein by the bacteria *B. pumilus* and *G. rubripertincta* during cultivation in minimal medium containing mineral protein Cry1Ac. The rate of growth of *B. pumilus* was higher in medium containing the Cry1Ac protein than with glucose and the bacteria *G. rubripertincta* in culture mineral medium containing glucose had a growth rate higher than that containing the Cry1Ac protein. It was verified Cry1Ac protein degradation by the bacteria *B. pumilus* and *G. rubripertincta* during cultivation in minimal medium containing Cry1Ac protein by SDS-PAGE gel and sequencing by mass spectrometry. Furthermore, the detection of protease genes has revealed the presence of the genes *apr* and *sub* were detected in these two bacteria and in soils planted with transgenic plants, while the gene the *npr* gene that was not detected in any soil, but in DNA from *B. pumilus*. These results show a first insight in the bacteria responsible for the Bt toxin degradation in soils.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus pumilus*. Cry1Ac protein. Transgenic cotton. Biodegradation.

INTRODUÇÃO

As pesquisas e o desenvolvimento tecnológico são e continuarão sendo requisitos básicos para o aumento da produtividade agrícola e a melhora da qualidade dos alimentos. Tal avanço permite que seja atendida a demanda mundial por alimentos. Dentre as inúmeras transformações de processos, ressaltam-se as associadas à área de melhoramento de plantas para o aumento qualitativo e quantitativo da produção mundial. Atualmente, pode-se recorrer às técnicas de engenharia genética, especialmente na sua vertente da transgenia, que compreendem operações com objetivo de modificação e transferência de genes entre diferentes organismos.

Uma planta transgênica é aquela que possui genes que originalmente não constituem seu genoma e foram desenvolvidas para apresentar novas características de interesse, como, por exemplo, a soja tolerante a determinados herbicidas. É o caso também das plantas com características de resistência a insetos-praga.

Atualmente as plantas transgênicas resistentes a insetos expressam genes derivados da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). A bactéria Bt pertence a uma linhagem bacteriana formadora de esporos quando sob condições de estresse, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, e que produz, durante esse processo, inclusões cristalinas responsáveis pela atividade tóxica contra alguns insetos. Essas inclusões são de natureza protéica e são denominadas “proteína Cry”. Tal cristal protéico, quando ingerido por determinadas lagartas, é solubilizado pelo pH alcalino (pH 9,5) do seu trato intestinal e clivado pelas proteases intestinais, transformando-se em peptídeos de menor tamanho que se ligam a receptores específicos do epitélio e iniciam um processo de lise tecidual, que leva o inseto a morte. Estas toxinas são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto a porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal.

Dentre as maiores culturas geneticamente modificadas para resistência a insetos comercializadas no mundo estão o algodão, a soja, o

milho e a canola. Como vantagens do uso de plantas transgênicas Bt, são comumente citadas: possível independência do controle das pragas em relação ao clima seja chuvoso para aplicações terrestres ou com presença de ventos para a aplicação aérea; proteção das partes das plantas que são difíceis de serem atingidas com as aplicações de inseticidas químicos ou biológicos; e uma alternativa para os produtores, diminuindo gastos excessivos com inseticidas químicos podendo ser uma vertente mais viável economicamente.

Apesar dos benefícios, existem possíveis riscos relativos das plantas Bt para com o meio ambiente. Dentre estes, os principais são: a seleção de populações de insetos resistentes às proteínas Cry; ocorrência de fluxo gênico para parentes silvestres dessas plantas levando a possível alteração de genótipo; impactos negativos ou positivos das proteínas Cry sobre as espécies não alvo e efeitos adversos no ecossistema e nas comunidades bióticas. Existe a possibilidade da proteína Cry, que é exsudada pelas raízes, ser depositada ou acumulada no solo, podendo assim vir a causar alguma alteração na biota do solo.

Como no desenvolvimento de qualquer nova tecnologia, um enfoque cuidadoso se faz necessário também para as plantas transgênicas. Em relação especificamente ao risco para a biota do solo pela sua exposição à toxina exsudada, se torna interessante a verificação da biodegradação da proteína Cry, expressa em plantas transgênicas, por bactérias da comunidade do solo.

Mais informações científicas sobre tal bioutilização permitirão uma melhor compreensão da dissipação e ou degradação por ação de bactérias do solo sobre essa proteína em culturas de plantas transgênicas que expressam o gene *cry* de Bt.

CONCLUSÃO

1) Seis espécies de bactérias isoladas de solo proveniente do cultivo de algodoeiro transgênico (Bt) e convencional demonstraram potencial de biodegradação da proteína Cry1Ac sendo que duas delas , identificadas como sendo *B. pumilus* e *G. rubripertincta* foram estudadas em mais detalhes nesse trabalho;

2) A bactéria *B. pumilus* se desenvolveu melhor do que *G. rubripertincta* em meio de cultivo mínimo mineral contendo a proteína Cry1Ac durante as 96 horas de cultivo;

3) O actinobactéria *G. rubripertincta* se desenvolveu melhor que *B. pumilus* em meio mínimo mineral contendo glucose até 48 horas de cultivo;

4) No período total de 96 horas de crescimento o actinobactéria *G. rubripertincta* se desenvolveu melhor em meio mínimo mineral contendo glucose comparado com a proteína Cry1Ac;

5) Foi confirmado o potencial de degradação da proteína Cry1Ac por *B. pumilus* e *G. rubripertincta* utilizando a análise de *SDS-PAGE*, e também que existe diferença no processo de degradação;

6) A degradação da proteína pelas bactérias foi confirmada por meio da análise de espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida - HPLC, sendo possível a identificação da seqüência de peptídeos em que a proteína Cry1Ac é decomposta;

7) As proteases dos grupos alcalino e subtilisina estão presentes na comunidade bacteriana indicando que essas enzimas podem estar envolvidas na degradação da proteína Cry1Ac no solo;

8) A identificação dos genes *apr* e *sub* foi possível em solo de cultivo de plantas transgênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGRIANUAL 2006. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2006. p.169.

AGUIAR, R. W. S.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. **Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, 2007.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. London: Academic Press, 1999.

SILVA, C. M. M. S.; Fay, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília, DF: Embrapa, 2004. Cap. 4, p.166.

ANDRADE, A.; CELEDÓN, P. A.; LABATE, C. A. O uso da proteômica no estudo da formação da madeira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX, n. 36, p. 10-37, 2006.

ARENSKÖTTER, M.; BRÖKER D.; STEINBÜCHEL A.; Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3195-3204, 2004.

ÁVILA, L. A. **Efeitos do algodão Bt (BOLLGARD® Evento 531) na comunidade bacteriana da rizosfera**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2007.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495–508. 2000.

BARETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymology**, v. 244, p. 1–15. 1994.

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

BAUMGARTE, S.; TEBBE, C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2539-2551, 2005.

BENDINGER, B.; KROPPENDTEDT, R. M.; KLATTE, S.; ALTENDORF, K. Chemotaxonomic differentiation of coryneform bacteria isolated from biofilters. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 474-486, 1992.

BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Risco e segurança ambiental: Efeitos potenciais da introdução de plantas transgênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 54-62, 2005.

BLACKWOOD, C. B.; BUYER, J. S. Soil microbial communities grown with Bt and non-Bt corn in three soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 832-836, 2004.

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.

BRUSETTI, L.; FRANCA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S.; SORLINI, C.; ABRUZZESE, A.; SACCHI, G.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L.; GIUNTINI, E.; BAZZICALUPO, M; DAFFONCHIO, D. Bacterial rhizosphere community of transgenic Bt176 maize and its non transgenic counterpart. **Plant Soil**, v. 266, p. 11-21, 2004.

COLEMAN, G. Studies on the regulation of extracellular enzyme synthesis by *Bacillus subtilis*. **Journal Genetic of Microbiology**, v. 49, p. 421-431, 1967.

CRECCHIO, C.; STOTZKY, G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 573-581, 2001.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, F.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, L.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 807-813, 1998.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "eletrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em: nov. 2001.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Parecer nº 0513/2005 - Algodão Bt.** Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/full/1260>>. Acesso em: set. 2006.

DEAN, D.H. Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnology Genetic Engineering Review**, v. 2, p. 341-363, 1984.

DELÚ-FILHO, N.; CASCARDO, J.C.M.; FONTES, E.P.B. Clonagem molecular e isolamento de genes de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1999. p. 354.

DESENBAHIA. Diretoria de Desenvolvimento de Negócios Gerência de Estudos e Assessoria Unidade de Estudos Econômicos e Pesquisas. **Boletim Anual do Mercado de Grãos: Algodão Safra 2008/2009**. Bahia: DESENBAHIA, 2008. p. 4.

DEVARE, M. H.; JONES, C. M; THIES, J. E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity, and diversity. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 837– 843, 2004.

DONEGAN, K. K.; PALM, C. J.; FIELAND, V. J.; PORTEOUS, L. A.; GANIO, L. M.; SCHALLER, D. L.; BUCAO, L.Q.; SEIDLER, R. J. Changes in leves, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurtaki* endotoxin. **Applied Soil Ecology**, v. 2, p. 111-124, 1995.

DOI, R. H. Role of proteases in sporulation. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 6, p. 1-20, 1972.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G.; MULLINS, M.; NYE, G.; CRAIG, J. KOZIEL, M. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepdopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

FEITOSA, J.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R.; DALKE, C.R.; PASTRO, F. Z.; TALAMINI, A. Isolamento de microrganismos degradadores de compostos lipídicos de origem vegetal em amostras de água da barragem do rio Passaú-Araucária, PR. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 21, p. 42, 2003.

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.

FERREIRA, L. H. P. L.; MOLINA, J. C.; BRASIL, C.; ANDRADE, G. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticidal protein effects on soil microorganisms. **Plant and Soil**, v. 256, p. 161-168, 2003.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnology**, v. 10, p. 208–217, 1992.

FINNERTY, W. M. Biosurfactants in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 291–295, 1994.

FISCHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MAR-RONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FUKA, M. M.; ENGEL, M.; GATTINGER, A.; BAUSENWEIN, U.; SOMMER, M.; MUNCH, J. C.; SCHLOTER, M. Factors influencing variability of proteolytic genes and activities in arable soils. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 40, p. 1646-1653, 2008.

GIORGIANNI, S. B. Proteoma analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in analytical chemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 273-281, 2003.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. O. **Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety**. New York: Wiley, 2000.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2nd ed. Macmillan New York: Publishers Inc, 1996. p. 3.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S. Q.; CAMPBELL, C. D.; Edwards, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 369-378, 1998.

GUZZO, J.; DUONG, F.; WANDERSMAN, C.; MURGIER, M.; LAZDUNSKI, A. The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 447-453, 1991.

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

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 29, p. 45–72, 1960.

HEAD, G.; SURBER, J. B.; WATSON, J. A.; MARTIN, J. W. DUAN, J. J. No detection of Cry1Ac protein in soil After multiple years of transgenic Bt Cotton (Bollgard) use. **Environmental Entomology**, v. 31, p. 30-36, 2002.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

ICOZ, I.; SAXENA, D.; ANDOW, D.; ZWAHLEN, C.; STOTZKY, G. Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn

expressing Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 647-662, 2008.

JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops: 2007. **ISAAA Briefs**, ISAAA, Ithaca, n.37, p. 4, 2008.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, p. 1–11 1998.

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. Host specificity in microbe-microbe interactions. **Bio Science**, v. 46, p. 406-409, 1996.

KRUGGER, E. L.; ANHALT, J. C.; SORENSON, D.; NELSON, B.; CHOUY, A. L.; TODERSON, A. A.; COATS, J. R. **Atrazine degradation in pesticide-contaminated soils: phytoremediation potential**. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 54-64.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas técnicas no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology Review**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LEVINSON, B.L. High-performance liquid chromatography analysis of two beta-exotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* Strains In: HICKLE L.A.; FITCH, W.L. (Ed.). **Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis***. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 115-136.

LÖVGREN, A.; ZHANG, M.Y.; ENGSTRÖM, A.; DALHAMMAR G.; LANDÉN, R. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 2137-2146, 1990.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Reviews of Genetic**, v. 37, p. 409-433, 2003.

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

MANN, M. HENDRICKSON, R. C. A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 437-473, 2001.

MANN, M.; WILM, M. Elettrospray mass spectrometry for protein characterization. **Trends in Biochemical sciences**, Amsterdam, v. 6, p. 219-224, 1995.

MENDELSON, M.; KOUGH, J.; VAITUZIS, Z.; MATTHEWS, K. Are Bt crops safe? **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1003-1009, 2003.

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, 2000. v. 3, p. 163-200.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. *Bragantia*, São Paulo, v. 64, p. 517-531, 2005.

MONTENEGRO, M.A.P. **Avaliação da performance de um reator anaeróbio híbrido (RAH) e da atividade das populações de microrganismos anaeróbios na ausência e na presença de pentaclorofenol (PCP)**. 2001. 222 f. Dissertação (Doutorado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.; Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Caderno de Ciências e Tecnologia**, v. 18, p.81-116, 2001.

PALM, C. J.; SCHALLER, D. L.; DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* d-endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1258-1262, 1996.

PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transformação genética de plantas. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Ed.). **Genética Vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2002.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: The first decade and beyond. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 311-323, 2003.

PELGZAR, M. J. Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; **Microbiologia, Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PIMENTA, A. M. C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, v. 32, p. 16-22, 2003.

PRIEST, F. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 711-753, 1977.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RUI, Y. K.; YI, G. X.; ZHAO, J.; WANG, B. M.; LI, Z. H.; ZHAI, Z. X.; HE, Z. P.; LI, Q. X. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 21, p. 1279–1284, 2005.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. **Nature**, London, v. 402, p. 480, 1999.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1225-1230, 2001.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Fate and effects in soil of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants. **Biosafety Reviews**, Roma, v. 1, p. 7-83, 2003.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 78, p. 2893-2897, 1981.

SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Protein toxins of *Bacilli*. In: HOCH, J.A.; SETLOW, Y. (Ed.). **Molecular biology of microbial differentiation**. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p. 209-216.

SHEN, R. F.; CAI, H.; GONG, W. H. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. **Plant and Soil**, v. 285, p. 149–159, 2006.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília, DF: Embrapa, 2004. Cap. 4, p. 166.

STAHLY, T. S.; G. L. CROMWELL, AND H. J. MONEGUE. Lactational responses of sows nursing large litters to dietary lysine levels. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 369, 1990.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. **Nature Reviews**, London, v. 33, p. 699-771, 2004.

TAPP, H.; STOTZKY, G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1786-1790, 1995.

TASKI-AJDUKOVIC, K.; NIKOLIC, Z.; VUJAKOVIC, M.; MILOSEVIC, M.; IGNJATOV, M.; D. PETROVIC. Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. **Meet Science**, v. 81, p. 230-232, 2009.

THOMZIK, J. E. Gene transfer in plants. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 49, p. 5-23, 1996.

TRIGUEIROS, D.E. G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol.** Dissertação (Mestrado) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, 2008.

UEHARA, H.; YONEDA, Y.; YAMANE, K.; MARUO, B. Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis*: transformation of high protease productivity. **Journal of Bacteriology**, v. 119, p. 82-91, 1974.

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.; MORSOLETO, R. V. Controle alternativo da podridão radicular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 29, 2003.

VALOIS, A. C. C. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 27-53, 2001.

WEI, X. D.; ZOU, H. L.; CHU, L. M.; LIAO, C. M.; LAN, C. Y. Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil. **Plant and Soil**, v. 285, p. 347-358, 2006.

WEI-XIANG, W.; QING-FU, Y.; HANG, M.; XUE-JUN, D.; WEN-MING, J. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and fosfatase activities in a flooded paddy soil. **Soil biology e Biochemistry**, v. 36, p. 289-295, 2004.

ZHANG, M. Y.; LÖVGREN, A.; LOW, M. G. LANDÉN, R. Characterization of a virulent pleiotropic mutant of insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipase. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4947-4954, 1993.

ZHU, Y. C.; ABEL, C. A.; CHEN, M. S. Interaction of Cry1Ac toxin (*Bacillus thuringiensis*) and proteinase inhibitors on the growth, development, and midgut proteinase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 39–46, 2007.