

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GUILHERME LUÍS DE OLIVEIRA CARVALHO

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIA FORMADORA DE ENDÓSPORO

PATOS DE MINAS – MG
JULHO 2026

GUILHERME LUÍS DE OLIVEIRA CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIA FORMADORA DE ENDÓSPORO**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

PATOS DE MINAS - MG

JULHO 2026

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C331
2026 Carvalho, Guilherme Luís de Oliveira, 2002-
IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE BACTÉRIA FORMADORA DE ENDÓSPORO [recurso eletrônico] /
Guilherme Luís de Oliveira Carvalho. - 2026.

Orientadora: Cristine Chaves Barreto.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Barreto, Cristine Chaves, 1968-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia.
III. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

GUILHERME LUÍS DE OLIVEIRA CARVALHO

Identificação e avaliação de atividade antimicrobiana de bactéria formadora de endósporo

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Cristine Chaves Barreto – Universidade Federal de Uberlândia - UFU Patos de Minas
Presidente

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – Universidade Federal de Uberlândia - UFU Patos de Minas
Membro

Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa – Universidade Federal de Uberlândia – UFU Patos de Minas
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, julho de 2026

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo, acima de todos, à minha família (mãe, pai e irmão), que sempre me apoiou em toda a minha vida e, em especial, na minha trajetória na faculdade. Agradeço também à minha segunda família, meus amigos dos grupos “Archer”, “Gatinhas e Feiosos”, “Lolzinho”, “Zênit” e muitos outros que me fizeram ter um lugar para retornar e algo tão importante que me fizesse sentir saudade genuína. O mesmo se aplica aos amigos que conheci em Patos e que permanecem na minha vida, como Junior, “Patetolândia”, “Os guri”, entre outros, assim como aos que já não estão mais comigo, mas fizeram parte de toda a minha história na faculdade. Agradeço aos meus professores e à técnica Carla Lima, que sempre me ensinaram com vontade e afinco para garantir que me tornasse o melhor profissional que eu poderia ser, em especial aos professores Guilherme Freitas, Gilvan Duarte e Diego Leoni, e às professoras Fabrícia Matos, Terezinha Teixeira, Daiane Resende, Sabrina Nunes e Hebréia Oliveira. Agradeço também ao meu orientador e grande amigo Thales Lima Rocha, à minha orientadora de estágio Juliana Dantas e, especialmente, à minha orientadora de TCC Cristine Chaves Barreto, por nunca duvidarem, e sim acreditarem no meu potencial até quando eu mesmo desacreditei. Por fim, agradeço à minha companheira, Meury Marry, que me apoiou em todo o TCC e na minha despedida do ambiente universitário como graduado, uma fase de muita evolução, conhecimento científico e de vida.

RESUMO

O uso de bioinsumos se destaca como uma alternativa sustentável em relação aos pesticidas sintéticos. Nesse cenário, bactérias esporulantes possuem relevância por produzirem uma diversidade de bioativos antimicrobianos que podem ser utilizados para confecção de biopesticidas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar uma bactéria esporulante isolada de solo do Cerrado e avaliar suas propriedades antimicrobianas. A bactéria foi adquirida da coleção de bactérias usadas nas disciplinas de graduação da Universidade Federal de Uberlândia no campus Patos de Minas e cultivada em meio de cultura não seletivo. Para identificação do isolado de solo, foi realizada a taxonomia polifásica com testes de morfologia de colônia, microscopia de Gram, morfologia celular, curva de crescimento (600 nm), caracterização antimicrobiana pelo método do traço cruzado, sequenciamento de Sanger do gene do rRNA 16S e análise filogenética por meio dos bancos de dados SILVA e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Os resultados morfológicos identificaram o isolado de solo como uma bactéria esporulante Gram-positiva com morfologia de bacilo e curva de crescimento com duração de 12 horas. A identificação por sequenciamento do gene do rRNA 16S foi confiável a nível de classificação do gênero como *Bacillus*, revelando similaridade do isolado de solo com o grupo do complexo de bactérias esporulantes *Bacillus cereus*, clado de extrema dificuldade em relação à caracterização taxonômica em nível de espécie. A análise filogenética corroborou a classificação do isolado ao grupo e o teste antimicrobiano apresentou um resultado negativo contra as cepas *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp. e *Salmonella*, apesar da gama de compostos antimicrobianos produzidos pelo gênero relatados na literatura. Os métodos de identificação utilizados não foram suficientes para discriminação do isolado de solo em nível de espécie, necessitando de futuros trabalhos multifacetados para melhor identificação.

Palavras-chave: Bioinsumos. Taxonomia polifásica. Cerrado. Gene do 16S rRNA.

ABSTRACT

*Bioinputs stands out as a sustainable alternative to synthetic pesticides. In this scenario, spore-forming bacteria have relevance because they produce a diversity of antimicrobial bioactives that can be used in the biopesticides formulation. Therefore, the present work aims to identify and characterize a spore-forming bacterium isolated from Cerrado soil and evaluate its antimicrobial properties. The soil isolate was acquired from bacteria collection used in undergraduate courses at the Universidade Federal de Uberlândia on the Patos de Minas campus and cultivated in a non-selective medium. To identify the soil isolate, a polyphasic taxonomy was performed with tests of colony morphology, Gram microscopy, cellular morphology, growth curve (600 nm), antimicrobial characterization by cross-streak method, 16S rRNA Sanger sequencing and phylogenetic analysis using the SILVA and National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases. Morphological results identified the soil isolate as a Gram-positive spore-forming bacterium with bacillus morphology and a growth curve lasting 12 hours. Identification by sequencing the 16S rRNA gene was reliable at the level of genus classification as *Bacillus*, revealing similarity of the soil isolate with the *Bacillus cereus* complex group of spore-forming bacteria, a clade of extreme difficulty regarding taxonomic characterization at the species level. Phylogenetic analysis corroborated the isolate classification to the group and the antimicrobial test presented a negative result against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp. and *Salmonella* strains despite the range of antimicrobial compounds produced by the genus reported in the literature. The identification methods used were not sufficient for discrimination of the soil isolate at the species level, requiring a future multifaceted work for better identification.*

Keywords: Bioinputs. Polyphasic taxonomy. Cerrado. 16S rRNA gene

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT: *Alignment Classification and Tree*
AN: Ágar Nutriente
BWB: Buffer B
CAGR: Taxa de Crescimento Anual Composta
CAM: Compostos Antimicrobianos
CIM: Concentração Inibitória Mínima
COV: Compostos Voláteis
CN: Caldo Nutriente
CWE: *Column Wash Solution*
MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
MLST: Tipagem de Sequências Multilocus
MLVA: Análise Variável em Múltiplos Locus
MUSCLE: *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NRPS: Peptídeo não Ribossomal
DO: Densidade Óptica
ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
pb: Pares de Base
PK: Poliquetídeos
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE: Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
RAPD: Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico
RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
TSB: *Trypticase Soy Broth*
UCB: Universidade Católica de Brasília
UFU: Universidade Federal de Uberlândia
X-CP: 5-bromo-4-cloro-3-indoxilcolinafosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Referencial Teórico.....	10
1.1.1 Pesticidas e biopesticidas	10
1.1.2 Bactérias esporulantes	11
1.1.3 Produção de antimicrobianos por <i>Bacillus</i>	12
1.1.4 Métodos para busca de antimicrobianos	14
1.1.5 Taxonomia polifásica de bactérias	15
1.2 Hipótese	16
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Cepa Bacteriana	16
3.2 Meios de Cultura.....	17
3.3 Repique da Cultura	17
3.4 Identificação Morfológica.....	18
3.4.1 Morfologia de colônia.....	18
3.4.2 Coloração de Gram e morfologia celular	18
3.5 Curva de Crescimento	18
3.6 Identificação Molecular	19
3.6.1 PCR de colônia e amplificação do gene rRNA 16S.....	19
3.6.2 Avaliação do amplicon em gel de agarose.....	19
3.6.3 Purificação e quantificação do amplicon	20
3.6.4 Sequenciamento do gene 16S e identificação molecular	21
3.7 Caracterização Antimicrobiana.....	21
3.8 Análise dos Resultados	22

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Identificação Molecular	22
4.1.1 Avaliação e quantificação de <i>amplicon</i>	22
4.1.2 Sequenciamento do gene 16S e identificação molecular	23
4.2 Identificação Fenotípica.....	24
4.2.1 Morfológica.....	24
4.2.2 Curva de crescimento.....	26
4.2.3 Caracterização antimicrobiana.....	27
4.3 Taxonomia Polifásica do Gênero <i>Bacillus</i>	28
5 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Bioativos bacterianos são de interesse agrícola já que podem ser usados na fabricação de bioprodutos mais sustentáveis e menos prejudiciais ao solo e ao meio ambiente. Moléculas com propriedades antimicrobianas e patogênicas a organismos não desejados como nematoides, fungos e insetos, ou de promoção de crescimento vegetal e nutrição do solo, podem ser usadas na manutenção de plantações, gerando maior sustentabilidade e potencial em marketing quando comparadas aos produtos de origem sintética. O uso de pesticidas químicos ocasiona prejuízo ambiental por contaminação do solo, água, fauna e flora com substâncias tóxicas. Dessa forma, observa-se um crescimento do mercado de biocontrole de pragas, com um aumento de 13,6% na Taxa de Crescimento Anual Composta (CAGR), a taxa que corresponde à rentabilidade de um investimento, mostrando um crescimento de mercado e diversas perspectivas futuras (Marrone, 2024).

O isolamento e cultivo de microrganismos *in vitro* permite a identificação de substâncias de interesse que possam compor novas formulações de bioprodutos. Nesse âmbito, as bactérias esporulantes estão entre os microrganismos mais utilizados quando se trata de bioinsumos, pois são capazes de produzir diversos bioativos de interesse. Outra vantagem das bactérias esporulantes é a facilidade do seu armazenamento, transporte e manipulação, devido à presença de endósporos de resistência às condições extremas.

Com base nesse cenário, o presente trabalho visou identificar genotipicamente e fenotipicamente uma bactéria esporulante isolada do solo do Cerrado para caracterização antimicrobiana e avaliação da viabilidade de formulação de um bioproduto. O presente trabalho aborda os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), definidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas Brasil:

“ODS 2. Fome zero e agricultura sustentável - Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável.”
(Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>).

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Taxonomia polifásica de bactérias

A taxonomia é a ciência que possui como objetivo geral estabelecer um sistema de classificação baseado em relações genealógicas, organizando de maneira ordenada organismos vivos, respeitando um sistema hierárquico. A classificação ordenada auxilia na pressuposição de relações evolutivas e fornece informações relevantes sobre a origem e a evolução da vida na Terra (Ferraz Helene; Klepa; Hungria, 2022).

Desde sua fundação até o final do século XX, a taxonomia bacteriana passou por transformações significativas, partindo de uma perspectiva puramente fenotípica para uma abordagem ampla e multifatorial (Lee *et al.*, 2025, p. 3). Características ecológicas, metabólicas e morfológicas compõem o método multidimensional de taxonomia polifásica que reflete não apenas relações genéticas, mas também a diversidade funcional e as adaptações ecológicas oferecendo uma visão em conjunto da diversidade microbiana (Lee *et al.*, 2025, p. 3).

Com o desenvolvimento e avanço do sequenciamento de DNA, genes marcadores foram utilizados para taxonomia, em especial o gene do rRNA 16S. O uso da sequência desse gene e o desenvolvimento de bancos de dados ocasionaram uma revolução na filogenia, tornando-se uma ferramenta primordial para a classificação de microrganismos, atuando como um marcador genético universal (Lee *et al.*, 2025). O gene do rRNA 16S é um marcador ideal devido à alta conservação e universalidade entre bactérias, cuja ausência acarretaria a incapacidade das bactérias de traduzirem o mRNA em proteína, tornando-as disfuncionais. Uma outra característica que torna o gene do rRNA 16S um alvo ideal são as suas nove regiões hipervariáveis (V1 – V9) que diferenciam espécies e gêneros bacterianos (Wensel *et al.*, 2022). A partir dessas características, é possível utilizar e projetar primers de reação em cadeia da polimerase (PCR) *forward* e *reverse* que se ligam a regiões conservadas e amplificam regiões variáveis (Wensel *et al.*, 2022).

1.1.2 Bactérias Esporulantes

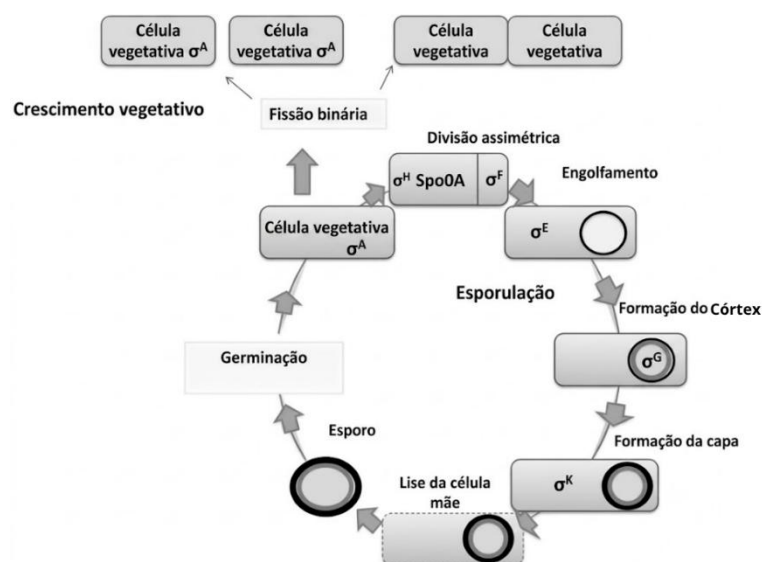
Algumas espécies de bactérias, encontradas predominantemente no solo, produzem endósporos no processo de esporulação (Madigan *et al.*, 2016). Os endósporos são estruturas resistentes, conferindo capacidade de permanência no estado latente, o que protege o organismo de desidratação, temperaturas elevadas, ácidos, bases e falta de nutrientes. Essas estruturas bacterianas podem permanecer na fase latente até que sejam reativadas em decorrência de condições ambientais favoráveis (Dionísio *et al.*, 2016). Além da resistência, essas estruturas

podem ser facilmente dispersas por diversos fatores, como vento, água ou animais por meio do trato gastrointestinal (Madigan *et al.*, 2016, p. 80).

Entre as bactérias esporulantes mais comuns e estudadas, destaca-se o gênero *Bacillus* (Madigan *et al.*, 2016). *Bacillus* formadores de endósporos passam por três processos fisiológicos em seu ciclo de vida: o crescimento vegetativo, a esporulação e a germinação (Figura 1). De acordo com a disponibilidade de nutrientes percebida pelo microrganismo, a bactéria transiciona entre cada fase (Sella; Vandenberghe; Soccol, 2014).

A reprodução bacteriana é realizada pela fase de crescimento vegetativo, na qual ocorre multiplicação por fissão binária simétrica quando há disponibilidade de nutrientes. A esporulação decorre durante a fase de privação de nutrientes, alta composição mineral, pH neutro, temperaturas extremas e alta densidade celular, desencadeando a formação do endósporo em estágios. Inicialmente, há a disposição do material nuclear de forma axial em filamentos, seguida da segregação do DNA e invaginação da membrana plasmática, formando dois polos celulares assimétricos, sendo o menor deles chamado de septo. O septo, então, se curva e o esporo é englobado pela membrana da célula-mãe, formando um pré-esporo que é desenvolvido com auxílio da célula-mãe, possibilitando a síntese das camadas interna e externa do esporo. Por fim, o esporo é maturado, tornando-se resistente a calor e solventes orgânicos. Após a formação completa, enzimas líticas rompem a célula-mãe e o esporo é liberado. A germinação se refere a um processo dos esporos, que permanecem viáveis e em dormência por longos períodos, devido à sua resistência. Em condições favoráveis, sua dormência é interrompida e o processo de crescimento se inicia, que termina com a emergência da célula vegetativa. Todo o processo está representado e esquematizado na Figura 1 (Sella; Vandenberghe; Soccol, 2014).

Figura 1 – Ciclo de vida de um *Bacillus* formador de endósporo.



Fonte: adaptado de Sella; Vandenberghe; Soccol, (2014).

1.1.3 Produção de antimicrobianos por *Bacillus*

Antimicrobianos são produtos químicos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento de microrganismos ou matá-los. Alguns microrganismos são capazes de produzir seus próprios agentes antimicrobianos, sendo de interesse na área clínica e agrícola (Madigan *et al.*, 2016). Dentre esses organismos, as bactérias do gênero *Bacillus*, assim como outras bactérias esporulantes, são capazes de produzir uma diversidade de substâncias antimicrobianas. Essas substâncias incluem peptídeos antimicrobianos (Cavalini *et al.*, 2021), lipopeptídeos cíclicos catiônicos (polimixina, octopeptina, polipeptina), não catiônicos (iturina, surfactina, lichenicina, fengicina, fusaricina) e catiônicos lineares (saltavalina, jolipeptina, cerexina) (Cochrane; Vederas, 2014). No gênero *Bacillus*, algumas espécies como *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu strictu*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (Cochrane; Vederas, 2014; Morandini *et al.*, 2024; Xuan *et al.*, 2023) produzem uma variedade de compostos antimicrobianos com potencial biotecnológico. Dentre essas aplicações, destaca-se o uso em conservantes alimentares, entomocidas, biopesticidas, antibióticos e tratamento de infecções multirresistentes (Cavalini *et al.*, 2021; Morandini *et al.*, 2024; Schnepf *et al.*, 1998; Xuan *et al.*, 2023).

1.1.4 Métodos para busca de antimicrobianos

A busca por novos compostos antimicrobianos segue metodologias utilizadas na área da saúde, como teste de estrias cruzadas, ensaio de cocultura, envenenamento de alimentos, curva

de letalidade diluição em ágar ou caldo, ensaio de resazurina, difusão de gradiente antimicrobiano, bioautografia em camada fina, citometria de fluxo, bioluminescência e medição de impedância (Hossain, 2024).

O ensaio de difusão em ágar consiste na difusão de agentes antimicrobianos de discos de papel, poços ou fragmentos (*plugs*) para o meio adjacente. O teste de traço cruzado é uma variação dos ensaios baseados em difusão em ágar, no qual o microrganismo-teste (o novo isolado) e indicadores (normalmente patógenos) são semeados em oposição, um após o outro. Em ambos, teste de estria cruzada e difusão em ágar, caso o microrganismo-teste produza um agente antimicrobiano que se difunde no meio, será observada a inibição do crescimento de microrganismos patógenos em um ponto de interseção (Bauer *et al.*, 1966 *apud* Hossain, 2024). Na cocultura, há o inóculo e crescimento simultâneo de dois microrganismos em um ambiente compartilhado (Jia *et al.*, 2020 *apud* Hossain, 2024). A técnica de envenenamento de alimentos é utilizada há séculos e consiste na avaliação de atividade principalmente antifúngica envolvendo a mistura direta da substância com o meio antes do inóculo do organismo (Schmitz, 1930 *apud* Hossain, 2024). A curva de letalidade avalia a atividade antimicrobiana expondo o inóculo a diferentes testes de concentração do agente antimicrobiano (Garcia, 2010 *apud* Hossain, 2024). Os métodos de diluição em ágar/caldo são semelhantes, a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) a partir da incorporação de diferentes concentrações do antimicrobiano no meio seguida da adição de um número padronizado de células microbianas (Golus *et al.*, 2016 *apud* Hossain, 2024).

Considerado um teste colorimétrico, o ensaio de resazurina (corante azul não fluorescente) mede a atividade metabólica de células vivas pela redução a resorufina (corante rosa fluorescente), em que a quantidade de resorufina produzida é diretamente proporcional à atividade metabólica das células (O'Neill *et al.*, 2014 *apud* Hossain, 2024; Sarker; Nahar; Kumarasamy, 2007 *apud* Hossain, 2024; Travnickova *et al.*, 2019 *apud* Hossain, 2024). Combinando princípios fundamentais de diluição e de difusão do agente microbiano, o teste de difusão de gradiente antimicrobiano consiste na diluição do agente antimicrobiano em uma tira de teste especializada que abrange uma faixa de concentrações, a qual é posicionada sobre a superfície do ágar inoculado com o microrganismo-teste (Berghaus *et al.*, 2015 *apud* Hossain, 2024). A bioautografia em cromatografia de camada fina (TLC) é uma técnica altamente eficaz e amplamente empregada, baseando-se na separação dos componentes de uma mistura em uma placa de TLC, seguida do bioensaio direto na placa para detecção dos componentes (Nuthan *et al.*, 2020 *apud* Hossain, 2024).

O princípio da citometria de fluxo se baseia no uso de lasers para detectar e medir características físico-químicas das células, permitindo uma análise rápida e simultânea de múltiplos parâmetros, podendo ser utilizada para avaliar efeitos de antimicrobianos em células, incluindo alterações de viabilidade celular, integridade de membrana e atividade metabólica (Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000 *apud* Hossain, 2024). Por meio de bactérias geneticamente modificadas que expressam enzimas emissoras de luz, o ensaio de bioluminescência serve como um indicador confiável de células microbianas viáveis. A medição de impedância é um método poderoso para detecção de alterações nas propriedades elétricas de células microbianas ao medir as alterações na impedância elétrica, as quais são registradas para avaliação da eficácia do antimicrobiano (Robinson *et al.*, 2011 *apud* Hossain, 2024).

1.1.5 Pesticidas e biopesticidas

O crescimento populacional ocorrido no século XX decorreu do aumento na produção de alimentos. Nesse cenário, o uso de pesticidas no combate de pragas que infectam e destroem plantações foi um fator crucial na redução de doenças e aumento da produtividade agrícola mundial (Tudi *et al.*, 2021).

Essas substâncias, que possuem ação inseticida, fungicida, herbicida, rodenticida, moluscicida e nematocida, tiveram sua produção intensificada especialmente após a Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Estima-se que a ausência do uso de pesticidas na agricultura acarretaria a perda de até 78% da produção de frutas, 54% da de vegetais e 32% da de cereais (Tudi *et al.*, 2021). Com o uso em massa de pesticidas sintéticos, surgem diversas questões ambientais, pois se trata de um grupo de substâncias bioincompatíveis. Sua degradação gera diversos compostos químicos nocivos ao meio ambiente que se deslocam através do solo e da água para outros ambientes, causando um impacto significativo, uma vez que sua degradação pode levar horas, dias ou até anos (Tudi *et al.*, 2021).

Como alternativa para os pesticidas sintéticos, biopesticidas foram desenvolvidos com o intuito de minimizar os impactos ambientais, por serem compostos de origem natural como uma alternativa mais segura e específica em relação aos pesticidas químicos convencionais (Mawcha *et al.*, 2025). Devido à sua origem de desenvolvimento, os biopesticidas são compatíveis com sistemas biológicos, atendendo às demandas de retardar e controlar o desenvolvimento de pragas, baixa ou nenhuma toxicidade ambiental e para os seres humanos, alta especificidade, atuando apenas contra a praga-alvo, biodegradabilidade, ou seja, eles são

degradados por organismos vivos, como fungos e bactérias e resistência a estresses ambientais (Mawcha *et al.*, 2025).

Os biopesticidas podem ser divididos em três subgrupos principais: biopesticidas bioquímicos, biopesticidas microbianos e biopesticidas macrobianos. Os biopesticidas microbianos são o maior subgrupo utilizado em campo para a eliminação de pragas sem afetar as culturas (Cai; Dimopoulos, 2024). Esses produtos podem ser obtidos a partir de bactérias, vírus, fungos, protozoários, microalgas e nematoides, sendo os mais comuns os bioherbicidas, biofungicidas e bioinseticidas (Cai; Dimopoulos, 2024).

1.2 Hipótese

Bacillus gram-positivo formador de esporos provenientes do solo apresenta potencial para a produção de substâncias bioativas antimicrobianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar uma bactéria esporulante do solo desconhecida e caracterizar quanto à sua atividade antimicrobiana para possíveis aplicações em bioprodutos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar e caracterizar genotipicamente e fenotipicamente a bactéria esporulante previamente isolada.
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana da bactéria obtida pelo método de estrias cruzadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepa Bacteriana

A cepa foi adquirida da coleção de bactérias usadas em disciplinas de graduação, como exemplo de bactéria gram-positiva esporulante. Esse isolado bacteriano foi obtido de amostras de solo coletadas em um canteiro localizado no campus Patos de Minas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Minas Gerais (latitude -18.584867° e longitude -46.511598°). O isolado foi cultivado em meio líquido *Trypticase Soy Broth* (TSB), enriquecido com glicerina como crioprotetor (Santos; Salomão, 2023), e congelado a -20 °C.

3.2 Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado no isolamento e no primeiro repique do isolado do solo foi o meio TSB, um meio complexo de utilização geral para cultivo de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos (Laborclin, 2024). Para preparo do meio TSB, foram utilizadas as instruções presentes no recipiente do produto, dissolvendo-o na concentração de 30 g/L em água destilada com fervura para auxílio da dissolução completa. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e deixado esfriar à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi vertida no tubo de ensaio e incubada na estufa por 24 horas para verificação de esterilidade. O meio é composto à base de caseína (17 g/L) e papaínico (3 g/L) de soja digeridos enzimaticamente para fonte de aminoácidos e substâncias nitrogenadas complexas, dextrose (2,5 g/L) como fonte de energia, cloreto de sódio (5 g/L) para equilíbrio osmótico e fosfato dibásico (2,5 g/L) como tampão, com pH 7,3 (Laborclin, 2024).

Para manutenção de cultura e repicagem, foram utilizados os meios complexos Ágar Nutriente (AN) e Caldo Nutriente (CN), compostos por Triptona (5 g/L), extrato de carne (3 g/L) e, no caso do AN, ágar bacteriológico (12 g/L), com pH 7 (Biokar Diagnostics, 2018). Para preparo do meio, foram utilizadas as instruções presentes no recipiente do produto, dissolvendo-se 28 g do produto por L de água destilada com fervura seguida da autoclavagem a 121 °C por 15 minutos para total dissolução e esterilização. Após a autoclavagem, 20 mL do meio ágar nutriente foi vertido ainda morno em cinco placas dentro da capela de fluxo laminar, as quais foram seladas e colocadas em uma incubadora BOD a 28 °C para teste de esterilidade.

3.3 Repique da Cultura

O microtubo contendo o microrganismo isolado foi retirado do congelador para descongelamento e realização do primeiro repique para reativação da cultura. Em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio TSB autoclavado, o conteúdo do microtubo foi inteiramente

vertido e inoculado na capela de fluxo laminar e levado à estufa a 37 °C, o qual serviu de solução estoque do microrganismo. Em conjunto, um estriamento foi realizado a partir da solução estoque em uma placa de Petri contendo meio AN para teste de esterilidade.

3.4 Identificação Morfológica

3.4.2 Coloração de Gram e morfologia celular e de colônia

Para identificação da morfologia de colônia, foi realizado um estriamento da solução estoque do isolado do solo em uma placa de Petri contendo meio AN, a qual foi incubada em estufa a 37 °C por 24 horas.

Com a placa estriada, foi realizado o método de coloração de Gram adaptado de Tripathi, Zubair e Sapra (2025), a partir de uma colônia isolada. Com uma alça de platina, uma colônia foi adicionada em uma gota de água sobre a lâmina de vidro e a seguir espalhada ao longo da lâmina. A fixação das bactérias na lâmina foi obtida com auxílio de um bico de Bunsen passando-a pelo fogo quatro vezes. Na lâmina fixada, foi adicionado o corante violeta genciana e deixado em repouso por 1 minuto, em seguida ela foi lavada com água destilada, procedimento o qual se repetiu com Lugol, incubando-se por mais um minuto. A seguir, a amostra foi lavada com acetona:etanol (1:1) por 12 segundos, lavada com água destilada e adicionou-se o corante fucsina básica por 1 minuto. A preparação foi lavada com água destilada e seca com papel toalha para remover o excesso de água. A lâmina foi observada em microscópio óptico em aumento de 1000x.

3.5 Curva de Crescimento

A curva de crescimento bacteriano foi realizada utilizando o método de medição de densidade óptica (DO) em comprimento de onda de 600 nm, adaptado do protocolo estabelecido pela Thermo Fisher Scientific (2024).

O meio CN foi preparado em sete Erlenmeyers contendo 150 mL cada: um controle negativo, sem inóculo bacteriano (controle de esterilidade), um para pré-inóculo (*overnight culture*), três para curva de crescimento em triplicata (pontos de absorbância ao longo do crescimento do organismo), um para branco (amostra que foi lido no início e em cada leitura realizada durante a curva de crescimento para calibração, referencial do equipamento e garantia de esterilidade) e um meio reserva.

O pré-inóculo foi realizado em meio CN a partir de 500 µL da solução estoque de microrganismos. Em paralelo, foi realizado inóculo por estriamento em uma placa de Petri contendo meio AN para verificação de contaminação. A cultura e a placa estriada foram incubadas a 37 °C em uma estufa por 16 horas. No dia seguinte, 500 µL do pré-inóculo foram adicionados em cada Erlenmeyer da triplicata contendo meio CN e o procedimento da curva de crescimento foi iniciado com uma leitura de absorbância com comprimento de onda de 600 nm. A cada duas horas, uma nova leitura no espectrofotômetro da cultura foi realizada, totalizando 8 leituras. Todas as leituras foram realizadas em uma bancada desinfetada com álcool 70% e com auxílio de um bico de Bunsen, utilizando-se 2 mL da suspensão bacteriana.

3.6 Identificação Molecular

3.6.1 PCR de colônia e amplificação do gene rRNA 16S

Para amplificação do gene do rRNA 16S, foi utilizada a técnica de *Colony* PCR, adaptada dos protocolos descritos por Sambrook e Russell (2001). Uma colônia da bactéria foi raspada de uma placa de Petri, diluída em um Eppendorf contendo 20 µL de água Nuclease-Free e agitada em vórtex por 10 minutos para obtenção de uma suspensão de células bacterianas contendo o DNA molde (template).

Para a reação de PCR foi utilizado o *Master Mix IB 2X* (PHT Biotecnologia & Serviços, 2024). Cada reação de 20 µL de volume final consistiu em: Tampão IB 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e *Taq* polimerase (concentração não informada pela Phoneutria), adicionando-se 0,2 mM de cada primer (27F e 1492R) que são os únicos componentes não presentes no *Master mix IB 2X*. Cinco reações foram preparadas: um controle positivo contendo 1 µL de DNA de *E. coli*, um controle negativo contendo 1 µL de água, e três amostras contendo 1 µL da suspensão das células.

As amostras foram levadas para o termociclador, iniciado na temperatura de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 segundos, anelamento de 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Após os ciclos, seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 5 minutos para formação completa dos amplicons e, por fim, o termociclador se manteve a uma temperatura de manutenção de 15 °C (PHT Biotecnologia & Serviços, 2024).

3.6.2 Avaliação do amplicon em gel de agarose

O DNA amplificado (*amplicon*) foi analisado em gel de agarose 1%, em tampão TBE (1X). Com a solução de agarose ainda quente, foram adicionados 2 μ L do corante *DSView* no Erlenmeyer e a solução foi agitada. O gel foi vertido no molde para gel, juntamente com o pente, deixado em temperatura ambiente para gelificar.

Soluções contendo 6 μ L de água, 2 μ L de amostra e 2 μ L de tampão de amostra (6X) foram preparadas e pipetadas nos poços do gel coberto com TBE (1X). Dos oito poços confeccionados, quatro foram preenchidos (DNA *ladder*, Controle positivo de *E.coli*, Controle negativo sem DNA e *amplicon* do isolado de solo). O marcador molecular utilizado foi o 1 Kb *Plus DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, 2026). A presença de bandas foi avaliada em transiluminador.

3.6.3 Purificação e quantificação do *amplicon*

A purificação do *amplicon* para remoção dos reagentes da PCR foi realizada usando-se o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante como descrito no protocolo Promega Corporation (2021).

O volume total de 60 μ L do amplicon proveniente da triplicata da reação de PCR foi adicionado a 30 μ L de *Binding Solution* em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL e agitado em vórtex por 5 segundos. Em seguida, 60 μ L de isopropanol foram adicionados no Eppendorf e o volume total foi transferido para uma minicoluna acoplada a um tubo de coleta e centrifugada em microcentrífuga a 10.000 g por 30 segundos. A coluna foi retirada e o tubo descartado, com a reposição de um novo tubo de coleta. Foram adicionados 200 μ L de *Column Wash Solution* (CWE) foram adicionados à coluna e centrifugada por 15 segundos. A coluna foi removida e o conteúdo do tubo de coleta foi descartado, retornando a coluna ao tubo de coleta. Duas lavagens consecutivas foram realizadas com 300 μ L de *Buffer B* (BWB) em cada coluna, as quais foram centrifugadas por 15 segundos. A coluna foi removida e o conteúdo do tubo de coleta foi descartado, a coluna foi recolocada no mesmo tubo e novamente centrifugada por 1 minuto com intuito de secar as colunas. As colunas foram transferidas a um tubo de eluição com adição de 15 μ L de água *Nuclease-Free* no centro da minicoluna encostando a ponta da pipeta na superfície da matriz, seguido de uma centrifugação por 30 segundos. O centrifugado foi obtido como DNA purificado e armazenado a -20 °C.

Para a quantificação do amplicon purificado foi utilizado o fluorômetro *Qubit* (Invitrogen). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, preparando-se os padrões contendo apenas 200 µL de *QuantiFluor® ONE dsDNA* e o padrão contendo 1 µL de DNA lambda fornecido no kit. O volume de 2 µL de DNA purificado foi adicionado a 198 µL de *QuantiFluor® ONE dsDNA*. O fluorômetro apresenta a concentração de DNA em µg/mL (Invitrogen Corporation, 2007).

3.6.4 Sequenciamento do gene 16S e identificação molecular

O DNA purificado foi encaminhado ao Laboratório de Sequenciamento de DNA/Genômica do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (UCB). O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger no equipamento *Spectrum Compact CE System Promega* com 4 capilares. A sequência foi recebida em um arquivo “.ab1” que foi analisado e editado utilizando o software BioEdit para a obtenção da sequência senso (27F) do gene rRNA 16S em formato FASTA, sendo removidas bases com baixa qualidade (*base calling*) na região 5’ e 3’.

A identificação taxonômica foi realizada com a ferramenta *Alignment Classification and Tree* (ACT) do banco de dados *SILVA SSU* (Chuvochina *et al.*, 2026). O *Silva ACT* serviu com intuito de identificação ao nível de família do isolado de solo, com um valor mínimo de 95% de identidade com a ferramenta *Search and classify* ativada. A obtenção das sequências de referência foi realizada utilizando a ferramenta *MEGABLAST* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990) com base no banco de dados rRNA/ITS do NCBI, comparando a sequência do isolado de solo com sequências de RNA ribossômico 16S de bactérias e arqueias com a opção de *Sequences from type material* ativada, com o parâmetro 50 *Max target sequences* e um *threshold* de 0,05. Mesmo com a opção que limita a busca por sequências de cepa-tipo, algumas espécies que apresentaram mais de uma referência foram manualmente substituídas por apenas uma sequência de cepa-tipo obtida no banco de dados do NCBI para representar a espécie na árvore filogenética. As sequências filogeneticamente mais próximas foram alinhadas pelo método *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) do software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 12.1.2. A árvore filogenética foi construída a partir da ferramenta *PHYLOGENY* pelo método de *Maximum Likelihood Tree*, seguindo o modelo Tamura 3-parameter com *bootstrap* de 1.000 réplicas.

3.7 Caracterização Antimicrobiana

A caracterização antimicrobiana foi adaptada do procedimento de estrias cruzadas descrito por Bauer *et al.* (1966 *apud* Hossain, 2024). Em uma placa de Petri contendo meio AN, o isolado do solo foi inoculado ao lado esquerdo até metade da placa e incubado para crescimento. Em seguida, seis patógenos bacterianos, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp. e *Salmonella*, foram inoculados em traços paralelos entre si e perpendiculares ao inóculo do isolado do solo sem se tocarem, deixando 1 cm de espaço entre as cepas, e incubados para crescimento. Todas as bactérias patogênicas foram obtidas da coleção de bactérias do laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas.

3.8 Análise dos Resultados

A análise dos resultados teve início com o sequenciamento do gene rRNA 16S para afunilamento e filtragem das buscas relativas ao gênero do isolado do solo. A partir do gênero, a morfologia bacteriana e de colônia e a curva de crescimento foram comparadas com outras cepas do mesmo grupo para maior precisão dos resultados.

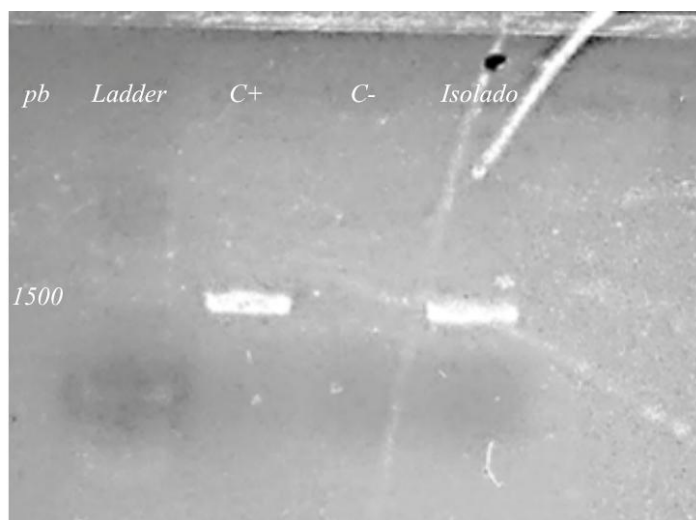
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação Molecular

4.1.1 Avaliação e quantificação de *amplicon*

A análise da eletroforese em gel de agarose revelou a amplificação de um fragmento de tamanho aproximado de 1500 pares de bases (pb) com bandas únicas e bem definidas, tamanho esperado do amplicon do gene do rRNA 16S (Johnson *et al.*, 2019) (Figura 2). Após a purificação, a concentração de DNA purificado obtida foi de 73,5 ng/μL, concentração acima da esperada de 10 a 40 ng/μL necessária de DNA molde para sequenciamento de Sanger de fragmentos entre 1.000 e 2.000 pb (Church *et al.*, 2020).

Figura 2 – Avaliação de amplicon do gene rRNA 16S em gel de agarose.



Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

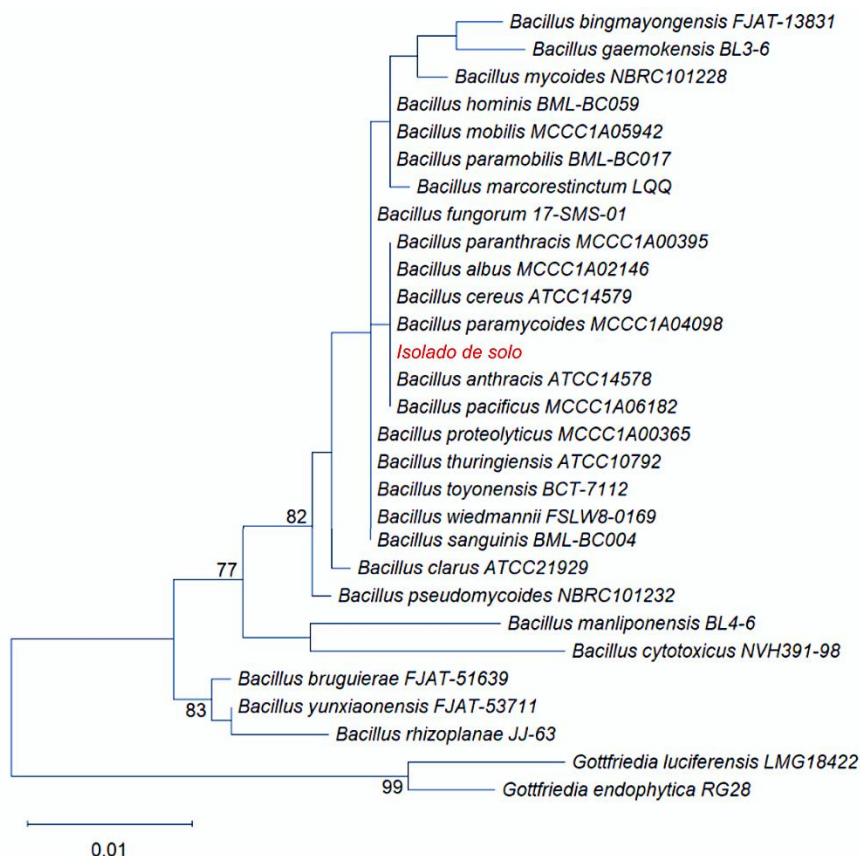
4.1.2 Sequenciamento do gene do rRNA 16S

O cromatograma obtido pelo sequenciamento de Sanger revelou picos nítidos e precisos, mostrando a boa qualidade do sequenciamento, e o processo de “trimming” das regiões 5’ e 3’ resultou em uma sequência de 630 pb devido a utilização apenas da sequência senso obtida do *primer* 27F, pois a amplificação da sequência consenso do *primer* 1492R não ter apresentado boa qualidade.

O banco de dados *SILVA* (Chuvochina *et al.*, 2026) identificou a bactéria como pertencente à família *Bacillaceae* (com uma confiança de 100%), que compreende uma das famílias de bactérias formadoras de endósporos (Kavamura *et al.*, 2013). O resultado da análise também apresentou 100% de identidade do isolado de solo ao grupo do *Bacillus cereus*.

Das 50 sequências de referência obtidas com o *MEGABLAST*, 3 cepas de *Bacillus thuringiensis*, 6 cepas de *Bacillus cereus*, 3 cepas de *Bacillus mycoides*, e 2 cepas de *Bacillus pseudomycoides* foram manualmente substituídas por apenas uma cepa-tipo de cada espécie, restando 40 sequências de referência, das quais, as 29 sequências mais próximas foram utilizadas para a construção da árvore filogenética do isolado do solo para melhor visualização e resolução (Figura 3).

Figura 3 – Árvore filogenética do isolado do solo com base no gene do rRNA 16S.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026)

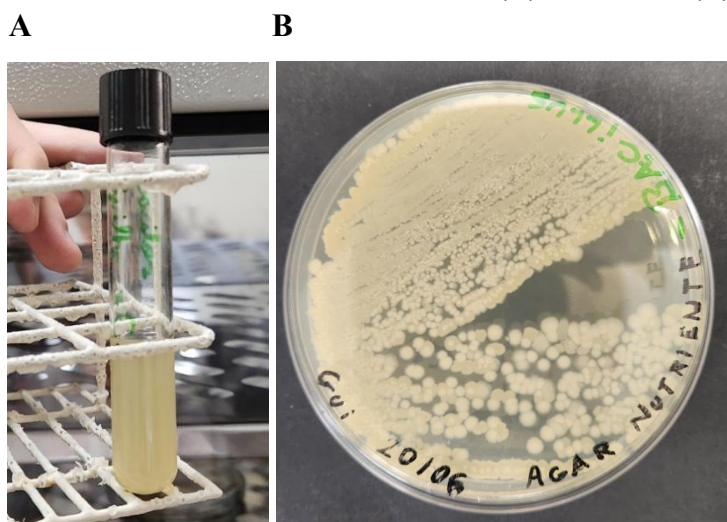
A árvore filogenética apresenta valores de *bootstrap* maiores que 70%. O nó pertencente ao isolado do solo relativo ao grupo *Bacillus cereus* apresentou valor menor que 70%, demonstrando baixa confiabilidade no agrupamento dos táxons dentro do grupo. O valor baixo decorre da capacidade limitada do sequenciamento de Sanger do gene do rRNA 16S de diferenciar espécies de *Bacillus* dentro do grupo *Bacillus cereus*. Algumas cepas como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*, por exemplo, apresentam mais de 99% de similaridade de sequências na estrutura primária (Kotiranta; Lounatmaa; Haapasalo, 2000). Além da similaridade interna, 55,32% dos alelos da sequência do 16S são idênticos entre outras espécies (Johnson *et al.*, 2019).

4.2 Identificação Fenotípica

4.2.1 Morfológica

Após 24 horas de incubação, o tubo de ensaio apresentou crescimento bacteriano evidenciado pela turbidez do meio. A partir desse tubo com meio TSB inoculado com o isolado do solo, um estriamento foi realizado em uma das placas de Petri previamente preparadas contendo meio AN e incubado em estufa a 37 °C. Nela, foi possível analisar que o isolado do solo apresentou colônias pequenas de forma circular, bordas e superfície lisas, opacas e foscas, na cor creme, consistência cremosa e elevação espraída (Figura 4).

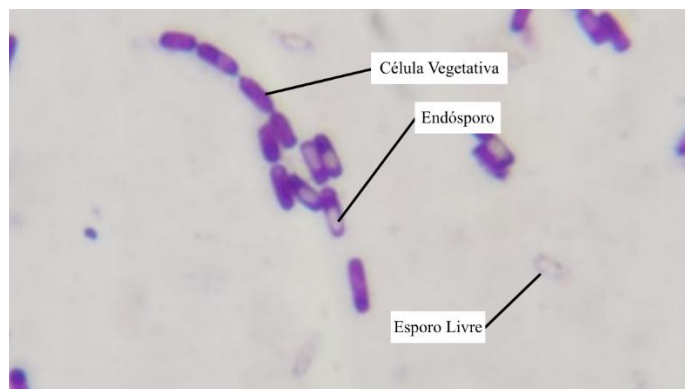
Figura 4 - Crescimento do isolado do solo em (A) meio TSB (B) Meio AN.



Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

A microscopia óptica revelou uma coloração púrpura característica de bactérias Gram-positivas (Figura 5). A comparação com diversas morfologias presentes na literatura, indicou que a forma mais similar é a de bacilo por apresentar uma forma cilíndrica, formando cadeias curtas. Outra estrutura evidenciada na microscopia é a presença de endósporos subterminais nas células vegetativas e esporos livres no meio.

Figura 5 – Fotomicrografia do isolado do solo evidenciando células vegetativas, esporângios e esporos livres.



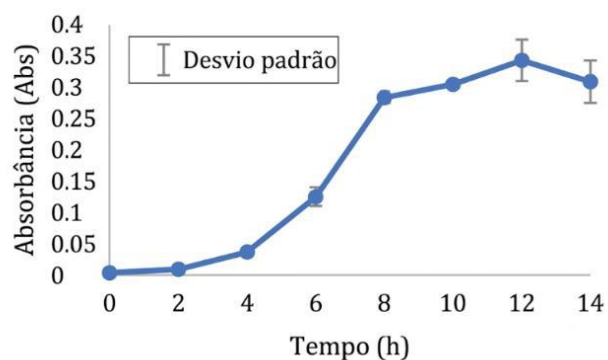
Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

A morfologia celular e de colônia do isolado de solo apresentou, de forma geral, semelhanças com algumas espécies do grupo *Bacillus cereus* para as quais foram encontradas imagens para comparação. As espécies *B. mycoides* e *B. paramycoides* foram descartadas por possuírem morfologia rizoide de colônia (Logan e De Vos, 2015; Nakamura e Jackson, 1995 *apud* Xu; Kovács, 2024). Em contrapartida, não foi possível determinar com clareza diferenças entre a morfologia do isolado do solo e a das espécies *B. thuringiensis* (Ferdiani *et al.*, 2023; Logan, 2011; Navya *et al.*, 2022), *B. toyonensis* (Basit *et al.*, 2025; Luo *et al.*, 2021; Mažylytė *et al.*, 2024) e *B. wiedmannii* (Ma *et al.*, 2024). Por fim, a morfologia celular e de colônia que apresentou maior similaridade ao isolado de solo foi a do *B. cereus* (Li *et al.*, 2018; Logan, 2011; Mahmoud, 2020).

4.2.2 Curva de crescimento

A curva de crescimento mostra a saída da fase *lag* nas primeiras duas horas e fase log evidente após quatro horas até a oitava hora após o inóculo. A fase de desaceleração começa na oitava hora, atingindo um platô (fase estacionária) entre a décima e a décima segunda hora, seguida da fase de morte (Figura 6). A curva de crescimento obtida no experimento corrobora resultados da literatura de experimentos realizados na faixa de temperatura de 37 °C com diversas cepas do grupo *Bacillus cereus* (Dong *et al.*, 2025; Duong-Nguyen *et al.*, 2022; Karetkin *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2026).

Figura 6 - Curva de crescimento do isolado do solo em triplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026)

4.2.3 Caracterização antimicrobiana

Após incubação dos microrganismos patógenos, não foi possível identificar a presença de halo de inibição por parte do isolado do solo, evidenciado pelo encontro das colônias entre as bactérias (Figura 7). Portanto, o ensaio antimicrobiano adaptado do método de estrias cruzadas mostrou-se negativo contra os patógenos *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus sp.* e *Salmonella*.

Figura 7 - Teste de estrias cruzadas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

Dentro do grupo *Bacillus cereus*, o resultado negativo do teste antimicrobiano pode ser utilizado como um método de diferenciação de espécies devido ao fato de os compostos antimicrobianos (CAM) serem frequentemente relatados entre os membros do grupo *Bacillus*.

cereus. O grupo também é capaz de produzir toxinas com importante valor patogênico por atividade hemolítica, citotóxica ou dermonecrótica (Kotiranta; Lounatmaa; Haapasalo, 2000).

Alguns exemplos de cepas produtoras de CAMs incluem o *B. thuringiensis* que já é utilizado como biopesticida por suas toxinas entomocidas, o *B. clarus*, utilizado na produção de antibióticos (Morandini *et al.*, 2024) e, potencialmente, quatro isolados de raiz amarela (*Arcangelisia flava*) intimamente ligados ao grupo *Bacillus cereus* que apresentaram compostos relacionados à atividade antimicrobiana contra patógenos bacterianos (Sipriyadi *et al.*, 2022). Algumas cepas de *B. cereus* são consideradas patógenos, juntamente com o *B. cytotoxicus* termotolerante e o *B. anthracis* causador do antraz. Já as espécies *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* não possuem tantos estudos de caracterização antimicrobiana (Morandini *et al.*, 2024).

Dentre os antimicrobianos já estudados no grupo, a maioria é composta por proteínas e peptídeos, sendo eles bacteriocinas, proteínas antimicrobianas, peptídeos de síntese de peptídeos não ribossomais (NRPSs) como cerulida, lipopeptídeos, sideróforos, poliquetídeos (PKs) e outros compostos não classificados. Existem também os antimicrobianos derivados de carboidratos como canosamina (propriedade antifúngica) e turingiensina (amplo espectro inseticida), os compostos voláteis (COVs) antibacterianos e antifúngicos e outros compostos diversos como indol, estilbeno e benzenoide (Morandini *et al.*, 2024).

4.3 Taxonomia Polifásica do Gênero *Bacillus*

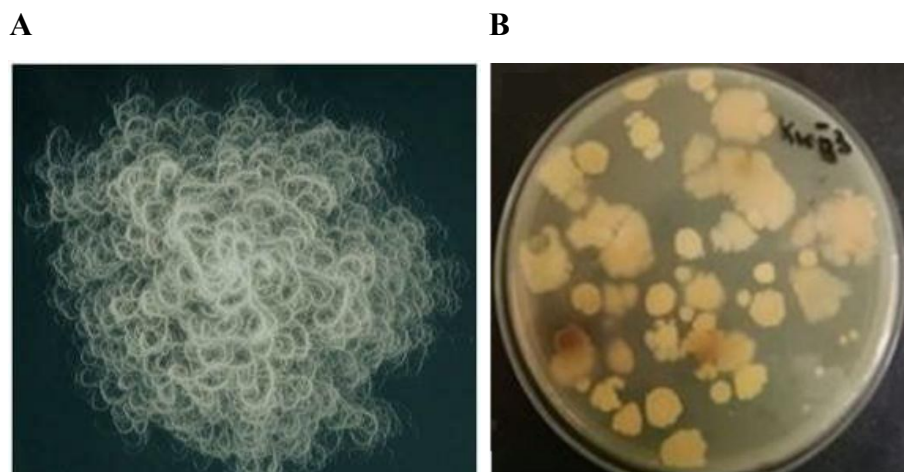
Por meio da identificação molecular e fenotípica do presente trabalho, o isolado de solo foi identificado como uma bactéria Gram-positiva pertencente ao grupo *Bacillus cereus* formador de endósporos e com atividade antimicrobiana nula contra os patógenos testados.

O grupo *Bacillus cereus* é, dentro da atual classificação, um dos dois principais clados do gênero *Bacillus* em conjunto com o grupo do *Bacillus subtilis* (Xu; Kovács, 2024). Sua caracterização taxonômica se torna difícil devido à sua heterogeneidade de características fisiológicas entre as espécies (Kotiranta; Lounatmaa; Haapasalo, 2000) e às sequências de genes de rRNA 16S muito semelhantes (Ehling-Schulz; Lereclus; Koehler, 2019). Sua taxonomia tem mudado drasticamente nos últimos 25 anos com a utilização de diversos métodos de caracterização. Nesse período, nove testes fenotípicos e sete testes moleculares foram realizados para identificar e diferenciar os seis membros originais do grupo definidos antes de 2013. Dentre esses testes, estão os de beta-hemólise em ágar sangue de carneiro, motilidade, coloração capsular, lise do fago gama, decomposição de tirosina, crescimento rizoide, formação

de cristais proteicos, crescimento em diferentes temperaturas e composição de ácidos graxos (fenotípicos). Com o avanço do sequenciamento de nova geração, testes moleculares como hibridização DNA-DNA, comparação de sequências ribossômicas (16S, 23S e espaço intergênico 16S-23S), amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), análises de repetições em tandem do número variável em múltiplos loci (MLVA), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), sequenciamento de gene único (*capC*, *groEL*, *gyrA*, *panC*, *pagA*, *rpoB*) e tipagem de sequência multilocus (MLST) também foram importantes para identificação das cepas originais (Carroll *et al.*, 2021).

Em decorrência de tantos métodos utilizados na identificação do grupo, no quesito taxonômico, os métodos abordados pelo presente estudo apresentam limitações quanto à diferenciação em nível de espécie. A identificação por fenótipo, que dentro do grupo *Bacillus cereus* é a principal característica para diferenciação preliminar de espécies (Carroll *et al.*, 2022 *apud* Xu; Kovács, 2024), pôde auxiliar apenas na exclusão de cepas com discrepância clara entre a morfologia comum ao grupo, como *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* (Figura 8).

Figura 8 - Morfologia rizoide de (A) *Bacillus mycoides* e (B) *Bacillus paramycoides*.



Fonte: A) Di Franco *et al.* (2002); B) Kalsoom *et al.* (2023).

Uma forma de contornar as limitações apresentadas no presente trabalho seria a utilização do meio de cultura ágar cromogênico seletivo R&F®. Este meio identifica exclusivamente espécies do grupo *Bacillus cereus*, como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* e *B. thuringiensis* com facilidade através da atividade positiva da enzima PC-PLC presente no grupo. O meio cromogênico é composto pelo substrato

cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoxilcolinafosfato (X-CP) que é hidrolisado pela PC-PLC, resultando na presença de uma rede de cores dentro da colônia bacteriana (Juergensmeyer *et al.*, 2006; Nguyen; Restaino, 2024).

5 CONCLUSÃO

O objetivo geral do presente trabalho foi parcialmente atingido. Os métodos fenotípicos e moleculares utilizados no estudo permitiram a identificação do isolado de solo até o nível de gênero, sendo esta inconclusiva em nível de espécie, com morfologia celular, de colônia e a curva de crescimento definidas. A caracterização antimicrobiana resultou negativa quanto à produção de antimicrobiano pelo isolado de solo, portanto, se mostrando inviável para formulação de um bioproduto bactericida contra os patógenos testados.

Para identificação precisa da espécie do isolado de solo, mais métodos fenotípicos, moleculares e bioquímicos como sequenciamento de genoma total, cultivo em meio seletivo, motilidade, hemólise, teste de aerotolerância e caracterização metabólica e enzimática podem ser feitos por futuros trabalhos. A falta de registros de fácil acesso tanto de microscopia quanto de morfologia de colônia na literatura dificulta a comparação de espécies bacterianas dentro do grupo *Bacillus cereus*, uma lacuna significativa devido à importância da fenotipagem na caracterização do grupo.

No presente momento, esta pesquisa inicial será utilizada apenas como material para sala de aula. Experimentos e trabalhos futuros podem utilizar esta monografia como base para uma identificação completa do isolado do solo, exploração das características antimicrobianas de maneira mais ampla e aplicações biotecnológicas no ramo de bioinsumos ou da saúde. Apesar do uso exclusivo em sala de aula, o microrganismo foi cadastrado no SisGen com o número de cadastro AFF2AB0.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- BASIT, A. *et al.* *Bacillus toyonensis* BAR1, a yellow-pigment producing endophyte of *Berberis aristata* DC: a potential source of bioactive and antimicrobial compounds. **Folia Microbiologica**, [S. l.], 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-025-01318-9>.
- BIOKAR DIAGNOSTICS. **Ágar Nutriente 2%: meio nutritivo**. Beauvais, França: Biokar Diagnostics, jan. 2018. Ficha técnica. Código do documento: GELOSE NUTRITIVE 2%_FR_V11.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. **MMA informa mudanças nos canais institucionais durante o período de defeso eleitoral**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima, 3 jul. 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias-defeso-eleitoral/mma-informa-mudancas-nos-canalais-institucionais-durante-o-periodo-de-defeso-eleitoral>. Acesso em: 8 jul. 2026.
- CAI, P.; DIMOPOULOS, G. Microbial biopesticides: A one health perspective on benefits and risks. **One Health**, [S. l.], v. 20, p. 100962, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100962>.
- CARROLL, L. M. *et al.* Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 62, n. 28, p. 1–26, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735>.
- CAVALINI, L. *et al.* Characterization of the antimicrobial activity produced by *Bacillus* sp. isolated from wetland sediment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 93, suppl. 4, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201820>.
- CHEN, Z.-M. *et al.* Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 1353–1360, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2162-x>.
- CHURCH, D. L. *et al.* Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 33, n. 4, e00053-19, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00053-19>.

CHUVOCHINA, M. *et al.* SILVA in 2026: a global core biodata resource for rRNA within the DSMZ digital diversity. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 54, n. D1, p. D334–D341, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1247>.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 4–31, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/med.21321>.

DENKOVA, R. *et al.* Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: mechanisms of interaction and methods of examination. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs**. [S. l.: s. n.], 2017. p. 201-212. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/334535091_Antimicrobial_activity_of_probiotic_microorganisms_mechanisms_of_interaction_and_methods_of_examination. Acesso em: 13 jul. 2026.

DI FRANCO, C. *et al.* Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. 1, 33, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-33>.

DIONÍSIO, J. A. *et al.* **Guia prático de biologia do solo**. 1. ed. Curitiba: Embrapa, 2016. 152 p.

DONG, Z. *et al.* Growth Kinetics of *Bacillus cereus* Vegetative Cells and Spores in Glutinous Rice Dough at Various Environmental Temperatures During Production. **International Journal of Food Science**, [S. l.], v. 2025, n. 1, p. 1180461, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1155/ijfo/1180461>.

DUONG-NGUYEN, T.-A. *et al.* Amoxicillin degradation ability of *Bacillus cereus* C1 isolated from catfish pond sludge in Vietnam. **Heliyon**, [S. l.], v. 8, n. 11, e11688, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11688>.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 7, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>.

FERDIANI, D. *et al.* Characteristics and Substrate Specificity of Semi-Purified Bacterial Protease of *Bacillus thuringiensis* HSFI-12 with Potential as Antithrombotic Agent. **Science and Technology Indonesia**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 9–16, 2023. DOI: <https://doi.org/10.26554/sti.2023.8.1.9-16>.

FERRAZ HELENE, L. C.; KLEPA, M. S.; HUNGRIA, M. New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2022, p. 1–19, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/4623713>.

HOSSAIN, T. J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: a review of protocols, advantages, and limitations. **European Journal of Microbiology & Immunology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 97–115, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>.

INVITROGEN CORPORATION. **Instruction Manual Qubit® Fluorometer**. [S. l.]: Invitrogen Corporation, 2007. Documento n° O-070233-r4 US 1007.

JOHNSON, J. S. *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>.

JUERGENSMEYER, M. A. *et al.* A Selective Chromogenic Agar That Distinguishes *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Food Protection**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 2002–2006, 2006. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.8.2002>.

KALSOOM *et al.* Isolation and screening of chromium resistant bacteria from industrial waste for bioremediation purposes. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 83, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242536>.

KAMAL, S. *et al.* Anthrax: an update. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 496–501, 2011. DOI: [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(11\)60109-3](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(11)60109-3).

KARETKIN, B. A. *et al.* A quantitative model of *Bacillus cereus* ATCC 9634 growth inhibition by bifidobacteria for synbiotic effect evaluation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2665-2>.

KAVAMURA, V. N. *et al.* Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 189–198, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00269-0).

KUMAKURA, D. *et al.* Disentangling the growth curve of microbial culture. **Journal of Theoretical Biology**, [S. l.], v. 573, 111597, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2023.111597>.

LABORCLIN. **TSB - Trypticase Soy Broth**. Rev. 09. Pinhais, PR: Laborclin, ago. 2024. Instruções de uso.

LEE, J.-Y. *et al.* Polyphasic and phylogenomic reevaluation of *Zhongshania* and *Marortus* with the description of *Zhongshania aquatica* sp. nov. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 15, n. 1, 20417, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08302-w>.

LI, L. *et al.* Colonization of *Bacillus cereus* NJSZ-13, a species with nematocidal activity in Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.). **Journal of Forestry Research**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 1025–1033, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0823-2>.

LOGAN, N. A. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 417-429, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>.

LUO, J. *et al.* Characterization of a Deep Sea *Bacillus toyonensis* Isolate: Genomic and Pathogenic Features. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.629116>.

MA, F. *et al.* Foliar application of microbial nano-selenium enhances selenium uptake and alleviates oxidative stress. **The Microbe**, [S. l.], v. 4, 100147, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100147>.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAHMOUD, M. A. **The antimicrobial effect of *Bacillus* secondary metabolites on human pathogen**. Orientadores: Amgad Rady, Tarek Ragab. 2020. Projeto de Pesquisa (Research Projects I) – Faculty of Biotechnology, October University for Modern Sciences and Arts (MSA), 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32627.04642>. Acesso em: 11 jul. 2026.

MAITRA, S. *et al.* Bioinoculants—Natural Biological Resources for Sustainable Plant Production. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 51, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010051>.

MARRONE, P. G. Status of the biopesticide market and prospects for new bioherbicides. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 81-86, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.7403>.

MAWCHA, K. T. *et al.* Recent Advances in Biopesticide Research and Development with a Focus on Microbials. **F1000Research**, [S. l.], v. 13, 1071, 2025. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.154392.5>.

MAŽYLYTĖ, R. *et al.* The Co-Inoculation Effect on *Triticum aestivum* Growth with Synthetic Microbial Communities (SynComs) and Their Potential in Agrobiotechnology. **Plants**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 1716, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13121716>.

MCBIRNEY, S. E. *et al.* Wavelength-normalized spectroscopic analysis of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growth rates. **Biomedical Optics Express**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 4034–4042, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1364/BOE.7.004034>.

MORANDINI, L. *et al.* *Bacillus cereus sensu lato* antimicrobial arsenal: An overview. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 283, 127697, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127697>.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2: Fome zero e agricultura sustentável**. Brasília, DF, 2026. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 11 jul. 2026.

NAVYA, R. N. S. *et al.* Characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* isolate RM11 toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, [S. l.], v. 32, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00553-3>.

NGUYEN, P. T.; RESTAINO, L. Isolation and Enumeration of the *Bacillus cereus* Group Using a Chromogenic Substrate that Targets Phosphatidylcholine Phospholipase C Activity. **Journal of Food Protection**, [S. l.], v. 87, n. 11, 100376, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100376>.

NGUYEN, T. N. *et al.* Cost-effective plant-based medium for enhanced spore production of *B. amyloliquefaciens* CN12 for biofertilizer application. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 16, n. 1, 12276, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-026-42679-6>.

PHT BIOTECNOLOGIA & SERVIÇOS. **Master Mix IB 2X - PCR**. Cód: R19, Versão: 2/2024. Belo Horizonte, MG: PHT Biotecnologia & Serviços, 2024. 1 p. Ficha técnica.

PROMEGA CORPORATION. **ReliaPrep DNA Clean-Up and Concentration System**: Instructions for Use of Products A2891, A2892 and A2893. Technical Manual TM540. Madison: Promega Corporation, 2021.

RODRIGUEZ, R.; KRISHNAN, Y. Genesis of next-generation sequencing. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 1709–1715, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01986-3>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1.

SAMREEN *et al.* Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 27, p. 101–111, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Guia prático de criopreservação**: técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2023. 37 p. (Documentos, 385). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1157590/1/DOC-385-Guia-pratico-de-criopreserva.-final.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2026.

SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 169, n. 12, p. 931–939, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.001>.

SHI, C. *et al.* Establishing a Rapid Enrichment Medium for *Bacillus cereus* to Shorten Detection Time. **Foods**, [S. l.], v. 15, n. 3, 466, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods15030466>.

SIPRIYADI *et al.* Potential Antimicrobe Producer of Endophytic Bacteria from Yellow Root Plant (*Arcangelisia flava* (L.)) Originated from Enggano Island. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2022, 6435202, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/6435202>.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **1 Kb Plus DNA Ladder**: Certificate of Analysis. Lote 10787018. Vilnius: Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, 23 jun. 2026.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Bacterial Growth Curves**: Analysis through OD600 measurements. [S. l.]: Thermo Fisher Scientific, 2024. Lesson plan. Documento nº FL64716_E 03/24M.

TRIPATHI, N.; ZUBAIR, M.; SAPRA, A. Gram Staining. In: **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>. Acesso em: 30 abr. 2026.

TUDI, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 18, n. 3, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.

WENSEL, C. R. *et al.* Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 132, n. 7, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI154944>.

XU, X.; KOVÁCS, Á. T. How to identify and quantify the members of the *Bacillus* genus? **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 26, n. 2, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16593>.

XUAN, J. *et al.* Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, [S. l.], v. 68, 100954, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100954>.

APÊNDICE A**Sequência do gene do rRNA 16S do isolado de solo**

>Isolado de solo

ATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA
TAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTAT
GGAKGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAA
CRATGCGTAGCCRACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAKG
TGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG
CAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTWAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTAC.