

**TAXONOMIA MOLECULAR
DE
Bacillus ENTOMOPATOGÊNICOS**

Taxonomia Molecular de *Bacillus* Entomopatogênicos

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Denise Akiko Kaji e aprovada pela Comissão Julg. 18.08.93.

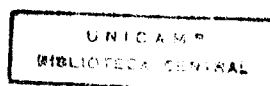
Denise Akiko Kaji
aluna



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos *OK*
orientador
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de *Doutor em Ciência de Alimentos*, área de *Microbiologia de Alimentos*.

Campinas
1993



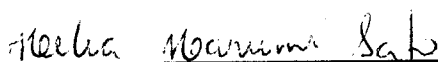
Banca Examinadora



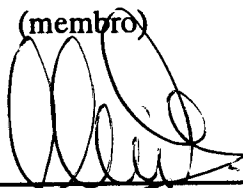
Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(orientador)



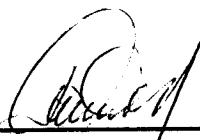
Profª Drª Yoko Bomura Rosato
(membro)



Profª Drª Hélia Harumi Sato
(membro)



Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(membro)



Prof. Dr. Fumio Yokoya
(membro)

Campinas (SP), /8 de agosto de 1993.

Aos meus pais, irmãs e Claudio com muito carinho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos pela orientação, apoio e estímulo demonstrados nestes quase dez anos de convívio de trabalho, contribuindo de forma decisiva para o meu desenvolvimento acadêmico.

Sou grata também à Prof^a Dra. Yoko Bomura Rosato (CBMEG-UNICAMP) pelo ensino de técnicas de Biologia Molecular e comentários críticos que acredito terem sido vitais para o desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. Fergus G. Priest pela atenção, apoio e a valiosa orientação durante a realização de parte deste trabalho no *Department of Biological Sciences* do *Heriot-Watt University* (Edinburgh, Escócia).

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya por ter despertado em mim, com suas excelentes aulas, o interesse pela fascinante área de Microbiologia.

Ao Yong Kun Park, Prof^a Dra. Hélia Harumi Sato (FEA-UNICAMP), Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva (FEA-UNICAMP) e Dr. Mauro Leitão (ITAL) pelo exame prévio do manuscrito e sugestões críticas sobre a tese.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA -UNICAMP) pelo fornecimento de larvas de *Aedes fluviatilis* e cepas de *Bacillus thuringiensis*.

À Prof^a Dra. Maria Silvia V. Gatti (IB-UNICAMP) pelo material cedido para os testes de hemólise.

À Dra. H. de Barjac (*Institut Pasteur*) pelas linhagens de B.t. e a análise da sorologia.

Ao Prof. Carlos F. S. Andrade (IB-UNICAMP) pelo fornecimento de linhagens de B.t.

A todos da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia *André Tosello* (FTPTAT) pela preservação das culturas de bactérias utilizadas neste trabalho.

À Paula M. Von Zuben pela valiosa ajuda durante parte da etapa de triagem de isolados entomopatogênicos e testes de caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica.

Ao Edilberto Princi Portugal (CPQBA-UNICAMP) pelos auxílios na coleta de amostras de solos e testes de entomopatogenicidade, e excelentes comentários sobre o *Bacillus thuringiensis* e criação de larvas de *Aedes*.

Ao Celso Eduardo Benedetti pela orientação na revelação e secagem do gel.

Ao Gilson P. Manfio pela orientação na eletroforese de proteínas e o cálculo do dendrograma.

À equipe do laboratório da Prof. Yoko B. Rosato (CBMEG-UNICAMP) pelas informações gerais de Biologia Molecular e a boa receptividade sempre recebida no transcorrer da tese, tornando nossas amizades mais intensas e solidificada.

A todos do laboratório S1 e S16 do *Department of Biol. Sciences, Heriot-Watt University* principalmente ao Mosen Yazdanian (Irã), Parvin Shariati (Irã) e Mas Rina Wati Haji Abdul Hamid (Brunei) pela inestimável ajuda com o idioma "escocês" e em diversas situações tornando a minha estada em Edinburgh gostosa e cheia de boas lembranças. Cheers!!!

Ao Sidnei de Souza, Carlos A. F. Brefe, Rosely A. L. Coelho, Adriano C. da Silva, Marcos A. Biaco, Maria H. A. Moraes e Patrícia da Base de Dados Tropical (BDT) da FTPTAT pelos diversos atendimentos recebidos, principalmente aos meus nervosos pedidos de socorro com o neurótico computador.

Ao Kevin Painting pela correção do inglês.

À Cristina Umino (FTPTAT) pelas fotografias.

À Norma T. N. Miya (FEA-UNICAMP) pela amizade e atenção solícita em tantas horas.

Ao Claudio Cardelli Freire pelo apoio e companheirismo. Mesmo estando separados por muitos quilômetros de distância recebi com carinho todos os seus *gambate kudasai*.

A todos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, principalmente a Rosa M. T. A. Tosello, Cícera de Souza, Jardette L. T. F. Campassi, Francelina F. Lima, Cristiane Alfredo e Telma S. T. A. Sallum pelos diversos serviços prestados.

À Alice Leiko Kaji por ter facilitado o trabalho de tese com o apoio financeiro na compra de um automóvel e computador.

Agradeço imensamente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio aos Estudantes (FAEP) pelo apoio financeiro recebido.

Agradeço também à Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia *André Tosello* pela impressão e fotografias da tese e a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) pelas cópias da tese.

RESUMO

Foi efetuado um estudo taxômico de 15 isolados entomopatogênicos de amostras de solos e insetos do Brasil com características de bactérias aeróbias, formadoras de endosporos e presença de cristal. Treze isolados acarretaram 100 % de mortalidade a larvas de *Aedes fluviatilis* em leituras observadas a 24 h. Os resultados dos testes de caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica indicaram que 14 isolados pertencem a espécie *Bacillus thuringiensis* (B.t.) enquanto que o 15º foi determinado como *Bacillus sphaericus* (B.s.). Através dos perfis eletroforéticos de proteínas totais 11 B.t. isolados foram identificados como subespécie *israelensis* (sorotipo H-14, incluindo duas linhagens não sorotipadas), 1 como *kurstaki* (sorotipo H3a, 3b) e 1 como *morrisoni* (sorotipo H8a, 8b). As linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (B.t.i.) formaram um grupo homogêneo distinto das linhagens de referências tóxicas a lepidópteros e coleópteros. O isolado identificado como *B. sphaericus* demonstrou alta similaridade com a linhagem 2362 através de testes de atividade larvicida, fagotipagem (fagotipo 3) e sorologia (H5). Os 11 isolados identificados como B.t.i. pela sorologia e/ou perfis eletroforéticos de proteínas totais não apresentaram polimorfismo quanto aos fragmentos de restrição, quando foram utilizadas sondas do gene 16S rRNA e do cristal de B.t.i.. A sonda do gene toxigênico de B.t.i. demonstrou ser bastante específica para a subespécie *israelensis*, não apresentando hibridizações com outras subespécies. O gene do cristal de B.t.i. de referência IPS82 e isolados identificados como B.t.i. foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), digeridos com *Sau3AI* e separados por eletroforese. Os perfis de restrição destes fragmentos foram idênticos. Esses resultados indicam que os B.t.i. isolados no Brasil formam um grupo homogêneo e de organização genética bastante conservada. Outras 28 linhagens de referência representando 12 subespécies de B.t. com 9 sorotipos diferentes, 4 *B. cereus* e 4 *B. anthracis* foram incluídas na análise do perfil de hibridização com o gene 16S rRNA. Os dados obtidos mostraram correspondência com os testes de sorologia (DE BARJAC & FRACHON, 1990) e a taxonomia numérica (PRIEST *et al.*, 1988).

SUMMARY

Fifteen bacterial isolates from Brazilian soil and insects with aerobic, endospores and crystal characteristics were taxonomically analysed. Thirteen strains were shown to be pathogenic to *Aedes fluviatilis* larvae causing 100 % mortality in 24 hours and two strains were non-pathogenic. The results of morphological, biochemical and physiological tests indicated that 14 strains belong *B. thuringiensis* (B.t.) while the remaining strain was identified as *B. sphaericus*. Electrophoresis of whole cell protein patterns helped in the identification of eleven isolates as *israelensis* (serotype H-14, including two non-serotypable strains), 1 as *kurstaki* (serotype H3a, 3b) and 1 as *morrisoni* (serotype H8a, 8b). Moreover, it was shown that all *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (B.t.i.) strains formed a homogenous group distinct from reference strains toxic for Lepidoptera or Coleoptera. The isolate identified as *B. sphaericus* presented high similarity with strain 2362 by larvicidal tests, phagotyping (group 3) and serotyping (H5). The isolates identified as subspecies *israelensis* by serology and/or electrophoresis of whole cell proteins patterns showed the same patterns using restriction fragments length polymorphisms (RFLPs) analysis with the 16S rRNA and the crystal gene of B.t.i. as probes. The crystal gene of B.t.i. used as the probe was specific only to the subspecies *israelensis*. The crystal gene of B.t.i. reference (IPS82) and isolated strains of B.t.i. were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), digested with *Sau3AI* and electrophoresed in agarose gel. The restriction fragment patterns obtained were identical. It confirmed as stated above that the B.t.i. isolates used in this study are a highly homogenous group with a conservative genetic organization. Furthermore, 28 B.t. reference strains representing 12 subspecies (with 9 different serotypes), 4 *B. cereus* and 4 *B. anthracis* were compared with regard to their ribosomal RNA gene restriction patterns. The results obtained match the serological tests (DE BARJAC & FRACHON, 1990) and numerical taxonomy studies (PRIEST *et al.*, 1988). The results in this study suggest that the techniques could be an alternative to serological tests.

ÍNDICE

	página
Resumo.....	i
Summary.....	ii
Índice.....	iii
Índice de Tabelas	vi
Índice de Figuras.....	vii
Introdução	1
Revisão bibliográfica	4
1. Principais insetos transmissores de doenças e sua resistência aos inseticidas químicos	4
2. Microrganismos entomopatogênicos.....	7
3. <i>Bacillus thuringiensis</i> : introdução	8
4. Taxonomia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
5. Toxina dos <i>Bacillus</i> entomopatogênicos.....	11
6. Genes toxigênicos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
7. Modo de ação das toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
8. Aplicação comercial do B.t.....	18
9. Desenvolvimentos recentes na triagem, melhoramento e aplicação de <i>Bacillus</i> entomopatogênicos	19
Material & Métodos.....	20
1. Isolamento de bactérias aeróbias e formadoras de endosporos	20
2. Teste de entomopatogenicidade.....	20
2. 1. Criação do mosquito <i>Aedes fluviatilis</i>	20
2. 2. Seleção e purificação de bactérias entomopatogênicas	22
2. 3. Determinação da massa celular seca	22
3. Linhagens de <i>Bacillus</i> utilizadas	23
4. Caracterização, identificação e classificação	23
4. 1. Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos.....	23
4. 2. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares totais	27
4. 2. 1. Preparo da amostra	27
4. 2. 2. Preparo dos géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	27
4. 2. 3. Eletroforese de proteínas celulares totais em gel de SDS-PAGE	29
4. 2. 4. Coloração de proteínas com nitrato de prata.....	29

4. 2. 5. Análise computacional dos géis de SDS-PAGE	30
4. 3. Estratégia geral utilizada para obtenção de polimorfismos dos fragmentos de restrição (<i>restriction fragments lenght polymorphisms</i> , RFLPs)	31
4. 3. 1. Extração e purificação do DNA genômico	31
4. 3. 2. Digestão dos DNAs com enzimas de restrição	32
4. 3. 3. Eletroforese do DNA	32
4. 3. 4. Transferência dos fragmentos de DNA da agarose para membrana de nitrocelulose (<i>Southern blotting</i>)	32
4. 3. 5. Obtenção da sonda marcada do gene 16S rRNA de <i>B. subtilis</i> através de reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
4. 3. 6. Obtenção da sonda de gene toxigênico referente a proteína 130 kD de B.t.i. por reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
4. 3. 7. Marcação da sonda do gene toxigênico de B.t.i.	38
4. 3. 8. Hibridização do DNA	38
4. 3. 9. Detecção do DNA hibridizado	39
4. 3. 10. Análise computacional dos perfis de restrição do gene ribossomal RNA	39
4.4. Perfis de restrição dos genes toxigênicos de B.t.i.	40
Resultados e discussão	41
1. Isolamento de <i>Bacillus</i> entomopatogênicos	41
2. Teste de entomopatogenicidade	41
3. Taxonomia de <i>Bacillus</i> entomopatogênicos	43
3. 1. Caracterização e identificação de <i>Bacillus</i>	43
3. 2. Caracterização e identificação de <i>Bacillus</i> a nível de espécie através de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos	46
3. 2. 1. Aspecto morfológico	46
3. 2. 2. Características bioquímicas e fisiológicas	47
3. 3. Caracterização e identificação do grupo de <i>B. sphaericus</i> e da subespécie de <i>B. thuringiensis</i>	49
3. 3. 1. Teste de sorologia	49
3. 3. 2. <i>Bacillus sphaericus</i>	49
3. 3. 2. 1. Atividade hemolítica de <i>Bacillus sphaericus</i>	52
3. 3. 2. 2. Degradação da adenina	52
3. 3. 2. 3. Fagotipagem de <i>B. sphaericus</i>	54
3. 3. 2. 4. Perfis de eletroforese de proteínas celulares solúveis totais de <i>B. sphaericus</i>	55

3. 3. 2. 5. Polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLPs).....	57
3. 3. 2. 5. 1. Obtenção das sondas moleculares	57
3. 3. 2. 5. 2. Perfis de hibridização com o gene 16S rRNA.....	59
3. 4. <i>Bacillus thuringiensis</i>	61
3. 4. 1. Teste de atividade hemolítica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	61
3. 4. 2. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares solúveis totais de <i>Bacillus thuringiensis</i>	63
3. 4. 3. Polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLPs).....	66
3. 4. 3. 1. Perfis de hibridização com o gene 16S rRNA.....	66
3. 4. 3. 2. Hibridização com sonda do gene do cristal 130 kD do Bti IPS 82.....	74
3. 4. 4. Perfis de restrição do gene toxigênico digeridos com <i>Sau3AI</i>	74
Conclusões.....	78
Apêndice.....	80
Referências Bibliográficas	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	página
1. Alguns importantes vetores de doenças humana e sua resistência a inseticidas químico	5
2. Número de casos de malária oficialmente registrados no Brasil.....	5
3. Designação dos isolados procedentes de amostras de solos.....	21
4. Procedência das linhagens de <i>Bacillus</i>	24
5. Relação dos testes para caracterização e identificação dos isolados.....	26
6. Volume das soluções estoques utilizados no preparo dos géis.....	28
7. Coloração do gel através da prata.....	30
8. Temperatura, tempo e ciclo de PCR do gene 16S rRNA de <i>B. subtilis</i>	35
9. Temperatura, tempo e ciclo de PCR do gene toxigênico	36
10. Sorotipo das linhagens de <i>Bacillus</i> e testes realizados para a caracterização e identificação	44
11. Características fenotípicas das linhagens de referência e isolados	48
12. Isolados identificados pela sorologia	50
13. Origem, fagotipo, sorotipo e toxicidade das linhagens de <i>B. sphaericus</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	página
1. Porcentagem de similaridade de 29 tipos de proteínas de <i>B. thuringiensis</i>	13
2. Transferência do DNA fragmentado contido no gel de agarose para membrana de nitrocelulose	33
3. Etapas gerais da hibridização <i>Southern Blotting</i>	34
4. Representação simplificada da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	37
5. Teste da atividade hemolítica de <i>B. sphaericus</i>	51
6. Teste da degradação da adenina das linhagens de <i>B. sphaericus</i>	53
7. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares solúveis totais de <i>Bacillus</i> <i>sphaericus</i> e dendrograma correspondente.....	56
8. Sondas moleculares de (a) 16S rRNA e (b) gene toxigênico, obtidos através de PCR com DNA genômico de <i>B. subtilis</i> S031 e <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> IPS82 respectivamente.....	58
9. (a) Fragmentos de DNA genômico do isolado CCT2261 digeridos com <i>Hind</i> III e <i>Eco</i> RI e (b) hibridização de (a) com o gene 16S rRNA de <i>B. subtilis</i>	60
10. Teste da atividade hemolítica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	62
11. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares solúveis totais de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> e dendrograma correspondente.....	64
12. Fragmentos de DNA genômico de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> digeridos com <i>Hind</i> III.....	67
13. Hibridização do DNAs genômico, digerido com <i>Hind</i> III, de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> com sonda de 16S rRNA	68
14. Dendrograma obtido da hibridização dos fragmentos de DNA, digeridos com <i>Hind</i> III, de <i>Bacillus anthracis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> com sonda 16S rRNA	69
15. Fragmentos de DNA genômico de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> obtidos com <i>Eco</i> RI	72
16. Hibridização dos DNAs genômico, digeridos com <i>Eco</i> RI, de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i> com sonda de 16S rRNA.....	73
17. Hibridização dos fragmentos de DNA genômico, digerido com (a) <i>Hind</i> III e (b) <i>Eco</i> RI, de B.t.i. com sonda do gene toxigênico de B.t.i. IPS 82	75
18. Produtos de PCR do (a) gene do cristal (b) digerido com <i>Sau</i> 3AI.....	77
19. Seqüência do gene toxigênico referente ao cristal 130 kD do B.t.i.	85

INTRODUÇÃO

O grande avanço nas pesquisas de combate aos insetos por agentes de controle biológico é devido principalmente a dois fatos: o aumento da resistência da população de certos insetos alvo aos agentes de controle químico e a preocupação em preservar o meio ambiente.

Dentre os microrganismos entomopatogênicos, o *Bacillus thuringiensis* (B.t.) é atualmente o agente de maior sucesso para o controle biológico de certos lepidópteros (mais de 182 tipos), coleópteros e dípteros (THOMAS & ELLAR, 1983). *Bacillus sphaericus*, de introdução mais recente, tem também demonstrado ser bastante promissor ao combate de dípteros (PRIEST, 1992).

A formulação de bioinseticida a base de B.t. vem sendo utilizada há mais de três décadas no combate de pragas agrícolas e, mais recentemente, no controle de insetos vetores de doenças humanas e animais.

Nos últimos anos, o sucesso das pesquisas de clonagem de genes de proteína do cristal e a expressão destes em microrganismos endófitos associados a plantas de interesse (OBUKOWICZ *et al.*, 1986) e plantas transgênicas (BARTON *et al.*, 1987; FISCHHOFF *et al.*, 1987; VAECK *et al.*, 1987) estimulou o uso de B.t. como alternativa contra insetos danificadores da agricultura.

Até pouco tempo atrás, não havia evidências observadas da resistência do inseto alvo ao bioinseticida. Porém, trabalhos recentes de MC GAUGLEY & BEEMAN (1988), STONE *et al.* (1989) e TABASHNIK *et al.* (1990) indicam a resistência de lepidópteros e dípteros ao produto de B.t.. Tem se notado também, a resistência de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* 2362 (SCHROEDER *et al.*, 1989). Embora, a resistência a produtos comerciais de B.t. não seja freqüente (PRIEST, 1992) é importante obter outras variedades com diferentes espectro inseticida para posterior substituição do produto. A vastidão da biodiversidade da fauna e flora do Brasil, concomitantemente com a presença de diversos insetos transmissores de doença tropicais incentiva a busca de linhagens de microrganismos entomopatogênicos para a erradicação das larvas de inseto praga ou vetor.

Antes de iniciar a produção industrial de bioinseticidas ou programas de melhoramento de produtividade através da clonagem de genes toxigênicos é importante conhecer as características das linhagens utilizadas assim como a especificidade dos hospedeiros. A maioria destas informações podem ser obtidas através de estudos taxonômicos. No entanto, o *taxon* de B.t. não

tem sido claramente definido com os recursos precários da taxonomia clássica e nem com os diversos métodos quimiotaxonômicos sofisticados. A espécie *Bacillus thuringiensis* pode ser confundido com *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*, onde a taxonomia polifásica revela ser a mesma espécie (SNEATH, 1986; PRIEST, 1992).

Pela classificação monotética ou artificial feita através da atribuição de maior peso a determinadas características, propõe que estas sejam espécies diferentes (CLAUS & BERKELEY, 1986). Neste caso, a principal característica diferencial é a patogenicidade a mamíferos ou insetos.

Outro critério de diferenciação é a presença de inclusões protéicas cristalinas em B.t., que podem ser facilmente observadas por microscopia com contraste de fase. Este cristal é o principal responsável pela patogenicidade em diversas larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros.

Embora, a formação do cristal de B.t. seja usualmente uma característica estável, pode haver formas acristalíneas de linhagens paternas. A bactéria sem cristal não apresenta toxicidade e torna-se indistinguível do *B. cereus*, exceto pelo sorotipo do antígeno H.

Antígenos H ou flagelar indicam 34 sorotipos que podem ser divididos em subfatores. Entretanto, nem todas as subespécies revelam correspondência entre a sorologia e a atividade patogênica (DE BARJAC & FRACHON, 1990). Com a descoberta de novas linhagens o aumento do número de subespécies de B.t. tem tornado este tipo de classificação inconveniente na prática.

Como a maioria dos genes dos cristais protéicos é codificada nos plasmídios, estes podem ser transferidos a outras linhagens, gerando um novo tipo de toxina pela presença de dois ou mais genes diferentes da toxina. Além disto, alguns destes podem estar associados com transposons (ARONSON *et al.*, 1986), o que pode invalidar a correlação entre o sorotipo e o tipo da toxina previamente existente em dada linhagem. Assim, há sugestões em classificar o B.t. com base na estrutura dos genes (HÖFTE & WHITELEY, 1989) e no perfil da patogenicidade (KNOWLES & ELLAR, 1988).

O emprego de técnicas de biologia molecular em taxonomia tem propiciado maior rapidez no teste e confiabilidade nos resultados de caracterização permitindo uma classificação mais estável. A partir de 1985, sondas de DNA referentes ao 16S rRNA de *Escherichia coli* foram introduzidas no mercado para diagnóstico clínico *in vitro* de organismos difíceis de serem identificados por outros métodos de taxonomia (RATNER, 1988). Sondas específicas de DNA podem ser obtidas a partir de regiões variáveis de 16S rRNA, designadas V2 e V6, que apresentam maior variação na disposição dos oligonucleotídeos entre as espécies comparadas a outras regiões do rRNA (BARRY *et al.*, 1990).

Diante das dificuldades em classificar B.t. através de técnicas convencionais, optou-se neste trabalho pelo emprego de taxonomia molecular para a avaliação dos isolados, principalmente, da subespécie *israelensis* (B.t.i.).

Primeiramente, foi feito o isolamento de bactérias aeróbias, formadoras de endosporos e de cristal e/ou patogênica ao *Aedes fluviatilis*. Através de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos os isolados foram identificados a nível de espécie. A identificação a nível de subespécie foi efetuada através de perfis eletroforéticos de proteínas celulares totais e de perfis hibridização com o gene do RNA ribossômico. Foram também considerados resultados de sorologia do antígeno flagelar (H).

Com a finalidade de averiguar a distribuição das subespécies de *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* foram obtidos 104 perfis de hibridização com gene 16S rRNA. As linhagens utilizadas foram: 4 *B. anthracis*, 4 *B. cereus*, 29 *B. thuringiensis* de referência e 15 isolados de solos ou insetos do Brasil. Experimentos de hibridização com a sonda marcada do gene toxigênico de B.t.i. foram efetuados com a finalidade de averiguar a similaridade deste gene nos isolados e nas demais subespécies.

As sondas moleculares foram obtidas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Como *primers* foram utilizados oligonucleotídeos do gene 16S rRNA e do gene do cristal 130 kD. Apesar desta técnica ser bastante recente (6 anos), ela tem sido bastante difundida no campo de Biologia Molecular. Neste trabalho, o seu uso substitue o método de clonagem de gene, o que permite a sua obtenção em curto espaço de tempo (4 a 5 horas) e não exige grande pureza do DNA a ser amplificado.

O gene toxigênico amplificado de B.t.i. de referência (IPS82) e de 11 isolados, identificados como B.t.i. por sorologia ou perfis eletroforéticos de proteínas totais, foram digeridos com enzima de restrição *Sau3AI* e separados por eletroforese em Nusieve Agarose 2 %. Os perfis dos fragmentos obtidos foram comparados com o intuito de averiguar a variedade entre os B.t.i. de referência e os isolados ambientais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Principais insetos transmissores de doenças e sua resistência aos inseticidas químicos

Além dos incômodos ocasionados pelos insetos pela sua simples ocorrência e irritações decorrentes de picadas, estes podem atuar como vetores de doenças como malária, febre amarela, encefalites, dengue, doença do sono, doença de Chagas, oncocercose, etc causando problemas de saúde pública. Também, podem causar danos indiretos ao homem, nas áreas agrícola e veterinária (ANDRADE, 1989).

Por outro lado, os insetos apresentam importante desempenho na natureza permitindo o reflorestamento do planeta através do processo de polinização. Considerando-se esses aspectos, seria ideal erradicar apenas os insetos transmissores de doença ou nocivos à agricultura. O combate dos insetos tem sido feito com a aplicação de agentes de controle químico, como organofosforados (OPs), carbamatos (Cs), 2, 2 bis-(p-clorofenil) - 1, 1, 1 - tricloroetano ou mais popularmente conhecido como p - p' dicloro difenil tricloroetano (DDT) e seus análogos, ciclodienos, etc (ROSS *et al.*, 1982). Normalmente, estes produtos químicos apresentam largo espectro de ação, acarretando toxicidade também ao homem e ao meio ambiente. Diversos insetos podem desenvolver resistências, muitas vezes cruzadas a esses produtos químicos, de estabilidade estrutural relativamente alta, persistindo por longos tempos nas superfícies depositadas. Com isto, gera-se acúmulo destes produtos, o que pode comprometer o equilíbrio do balanço biológico na natureza.

Já as propriedades inseticidas de *Bacillus thuringiensis* e *B. sphaericus* oferecem perspectivas atraentes como medida de controle biológico por serem específicos a apenas alguns tipos de insetos (VANDEKAR & DULMAGE, 1982) e terem custo operacional baixo (CRUEGER & CRUEGER, 1984).

A relação entre algumas doenças, parasitas e vetores, bem como, a resistência dos vetores a produtos químicos está indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns importantes vetores de doenças humana e sua resistência a inseticidas químicos (VANDEKAR & DULMAGE, 1982).

doença	parasita	vetor	resistência
malária	<i>Plasmodium</i>	<i>Anopheles</i>	DDT, OPs, Cs
febre amarela e dengue	vírus	<i>Aedes</i>	DDT, OPs, Cs
encefalite	vírus	<i>Aedes e Culex</i>	DDT, OPs, Cs
filaríase	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Aedes, Culex, Mansonia</i>	DDT, OPs, Cs
oncocercose	nematóide	<i>Simulium</i>	OPs

DDT- p-p' dicloro difenil tricloetano, OP - organofosfato e Cs - carbamato

Parte destas doenças são constantes preocupação nos países tropicais em desenvolvimento. Os registros no Brasil de casos de malária vem crescendo continuamente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de casos de malária oficialmente registrados no Brasil

ano	número de casos
1974	64.320
1977	104.436
1978	121.577
1984	378.257
1990*	577.520

* dados obtidos no primeiro semestre de 1990 (SUCEM, 1990b).

Além das regiões consideradas endêmicas como a Amazônia Legal formada pelos estados do Pará, Amazonas, Amapá, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Goiás, Tocantins e Maranhão, tem ocorrido focos extra-endêmicos em outras regiões do país. Em 1989, foram constatados 4.111 casos de malária no Paraná, 2.215 em São Paulo, 760 em Espírito Santo, 676 no Rio Grande do Sul e outros estados (SUCEM, 1990a). No entanto, a região da Amazônia Legal é responsável por cerca de 99 % dos casos de malária do país.

Dentre as espécies parasitárias frequentemente associadas a surtos de malária destacam-se: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (SUCEM, 1990b). É de conhecimento no Brasil, de mais de 50 espécies de mosquitos anofelinos vetores de malária, destacando-se *Anopheles darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus*, *An. strodei*, *An. evansae* e todos do subgênero *Nyssorhynchus* (DEANE, 1984).

A febre amarela, doença virótica veiculada pelo *Aedes aegypti* foi constatada em 13 casos em 1974, 45 em 1984, 21 em 1988 e 9 em 1989 (SUCEM, 1990a). O declínio de casos de febre amarela tem sido alcançado graças a medidas adotadas pelo governo no controle do vetor urbano (*Ae. aegypti*) e a vacinação na população.

O Brasil é considerado como o país detentor de maior área enzoótica para febre amarela no mundo. Assim, há frequentes riscos de reurbanização dessa doença. Até março de 1990, 122 municípios brasileiros se apresentaram positivos para *Ae. aegypti* e 93 municípios positivos para *Ae. albopictus* (SUCEM, 1990a).

A transmissão do dengue tem como vetores o *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. scutellares polynesiensis* e *Ae. shebridens*. Esta doença pode ser ocasionada por 4 tipos antigênicos do vírus *Flavivirus* (WESTAWAY *et al.*, 1985) sendo que a forma de febre hemorrágica tem causado maior índice de mortalidade de crianças em muitos países do sudeste da Ásia (GUZMAN, citado por ANDRADE, 1989). Normalmente, esta doença não é fatal, porém pode reduzir drasticamente a força trabalhadora. Em 1977, as vítimas da doença dengue de Porto Rico acarretaram em torno de 6 a 15,6 milhões de dólares de prejuízo (VON ALLMEN *et al.*, 1979).

Em 1986 e 1987, cerca de 200 mil pessoas contraíram dengue em Niterói (Folha de São Paulo, 08.12.1990). Os casos notificados de acordo com a sintomatologia da dengue clássico de janeiro a julho de 1990 foi de 1.028, em Mato Grosso do Sul, 5.661 no Ceará, 11 em São Paulo e 17 em Alagoas. De janeiro a julho de 1990, foram notificados 3.659 casos de dengue no estado do Rio de Janeiro, sendo que 613 foram confirmados por sorologia. Destes, 45 foram causados pelo vírus II (dengue hemorrágico) que se manifesta nas pessoas previamente sensibilizadas pelo vírus I (SUCEM, 1990a).

2. Microrganismos entomopatogênicos

Embora se saiba da existência de diversos microrganismos entomopatogênicos, poucos deles apresentam viabilidade para o uso como agente de controle biológico dos insetos.

Dos entomopatogênicos conhecidos, os vírus são os que apresentam maior variedade com mais de 650 tipos. Cinco dos protozoários testados, *Nosema locustae*, *N. algerae*, *N. pyrausta*, *Vairimorpha necatrix* e *Mattesia trogodermae* apresentam propriedades de inseticidas (CRUEGER & CRUEGER, 1984). Fungos e bactérias são comercialmente mais promissores como agente de controle biológico de insetos pela sua habilidade de produzir inseticidas por via fermentativa e pelo modo de atuação nos insetos alvos. Enquanto que os vírus agem somente em estado reprodutivo, os fungos atuam por infecção e as bactérias por toxinas (VANDEKAR & DULMAGE, 1982). Os fungos *Aschersonia aleyrodis*, *Metarrhizium anisophae*, *Hirsutella thompsonii* e *Beauveria bassiana* apresentam amplo espectro de ação de patogenicidade aos insetos, porém tem demonstrado baixa atividade em relação a outros agentes mais específicos (CRUEGER & CRUEGER, 1984).

Das bactérias patogênicas aos insetos as principais são *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. larvae*, *B. lentimorbus* e *B. popilliae* (SNEATH, 1986; PRIEST, 1989b). Destas bactérias, *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* tem demonstrado serem promissores para produção industrial de bioinseticidas. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* é mais eficiente contra as espécies de *Aedes*, enquanto o *B. sphaericus* parece ser mais ativo contra as espécies de *Anopheles* (SINGER, 1980; PRIEST, 1989b). *B. sphaericus* apresenta também alta atividade ao *Culex quinquefasciatus*, moderada atividade ao *A. maculatus* e *Mansonia uniformis* e inativos ao *A. aegypti* e *Armigeres durhami* (LEE, 1988).

As linhagens de *B. thuringiensis* podem acarretar toxicidade a ampla variedade de larvas de lepidópteros, coleópteros e alguns dípteros. O *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (sorotipo 14) tem se destacado por apresentar bom desempenho como pesticida a dípteros, enquanto as subespécies como *kurstaki*, *finitimus*, *kysheunsis*, *thompsoni* e *indiana* apresentam atividade larvicida em lepidópteros. Já as subespécies *tenebrionis* e *san diego* tem revelado atividade larvicida em coleópteros.

B. popilliae e *B. lentimorbus* são conhecidos como causadores de doenças nas larvas de escaravelhos japoneses (Coleoptera) e *chafer* européia. Estes insetos acarretam grandes prejuízos a cada ano para uma variedade de plantas. Ambas bactérias causam doença de aspecto leitoso nos hospedeiros. A larva infectada torna-se branca e leitosa devido a produção de esporos na hemolinfa da larva (TASHIRO & WHITE, 1954).

B. larvae é patógeno às abelhas produtoras de mel. Tanto *B. larvae* como *B. poppiliae* apresentam dificuldade em produzir esporos em condições de laboratório, (STAHLY & KLEIN, 1992) não apresentando portanto potencial comercial (ARONSON *et al.*, 1986).

3. *Bacillus thuringiensis*: introdução

De acordo com NORRIS (1970) B.t. foi primeiramente isolado de bicho da seda doente por Ishiwata em 1902. Em 1915, uma bactéria similar foi isolada de larvas de mariposa doentes (*Anagasta kühniella*) por Berliner que a designou *Bacillus thuringiensis* (B.t.).

Logo após o início da II Guerra Mundial foi comercializado o primeiro inseticida a base de B.t. (*Sporeine*) (NORRIS, 1970). A aplicação deste bioinseticida visava o combate de pequeno número de espécies de lepidópteros encontrados em várias plantações e árvores de florestas (ROWE & MARGARITIS, 1987; JUTSUM, 1988).

Posteriormente, foram descritas linhagens de B.t. com toxicidade mais abrangente, como por exemplo, a dípteros (GOLDBERG & MARGALIT, 1977; MARGALIT & DEAN, 1985) e coleópteros (KRIEG *et al.*, 1983; HERRNSTADT *et al.*, 1987; RUPAR *et al.*, 1991), assim como linhagens contendo cristal protéico diferente dos existentes e com toxicidade desconhecida (OHBA & AIZAWA, 1986; OHBA *et al.*, 1987; RODRIGUEZ-PADILLA *et al.*, 1990) e sorotipos diferentes (OHBA & AIZAWA, 1990).

Os isolados com toxicidade inseticida desconhecida foram classificados como subespécie *ostriniae*, *indiana*, *colmeri*, *tohokuensis*, *kumamotoensis*, *tochigiensis* e *neoleonensis* (RODRIGUEZ-PADILLA *et al.*, 1990).

4. Taxonomia de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (B.t.) são bastonetes, *Gram* positivos, anaeróbio-facultativos, com capacidade de produção de endosporos com forma elipsóide e catabolizar poucos açúcares (SNEATH, 1986 e PRIEST *et al.*, 1988). A principal característica do B.t. é a presença de inclusões cristalinas responsáveis pela toxicidade a certas larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros.

Segundo GORDON *et al.* (1973) a identificação de *Bacillus thuringiensis* pode ser feita através da análise morfológica das células e uma bateria de testes bioquímicos e fisiológicos. No entanto, apesar do número expressivo de testes, nem sempre se chega a resultados conclusivos, além de consumir muito tempo e material. A leitura destes testes revelam haver grande similaridade do *B. thuringiensis* com o *B. cereus* e o *B. anthracis*, que não apresentam inclusões cristalinas protéicas na célula. A realização de 50 testes de caracterização de uma linhagem de *Bacillus* pode representar apenas 1 a 3 % do potencial genético (CLAUS & FRITZE, 1989), o qual é fonte de toda informação taxonômica. O seqüenciamento do genoma inteiro da bactéria é prática inviável apesar das técnicas disponíveis atualmente. O que se tem feito é a comparação dos genomas bacterianos entre si, onde o DNA de uma bactéria desconhecida é disposta de maneira que o DNA da bactéria de referência possa ser pareado e a homologia entre os DNAs calculada. Porém, os resultados obtidos por esta técnica também não tem permitido diferenciar o *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* (SOMERVILLE & JONES, 1972; KANEKO *et al.*, 1978; SEKI *et al.*, 1978; SNEATH, 1986). As propriedades patogênicas características a cada espécie demonstram evidências suficientes para as manterem classificadas como espécies distintas e diferenciadas (CLAUS & BERKELEY, 1986). Enquanto B.t. não apresenta patogenicidade a mamíferos, o *B. anthracis* é patogênico a mamíferos e o *B. cereus* tem sido isolado de amostras envolvidas em surtos de intoxicação alimentar (SNEATH, 1986).

Outras técnicas como eletroforese de enzimas (ZAHNER *et al.*, 1989), taxonomia numérica (PRIEST *et al.* 1988) e quimiotaxonomia (KANEDA, 1977; SNEATH, 1986) não são suficientes para uma boa distinção destas linhagens. Técnicas quimiotaxonômicas não ajudam na diferenciação destas bactérias pelo fato delas apresentarem composição de ácidos graxos totais, composição da parede celular e quinonas isoprenóides similares entre si (SNEATH, 1986). Já os dados obtidos através da pirólise seguida de cromatografia gasosa tem demonstrado resultados que permitem a diferenciação das espécies. *B. cereus* demonstrou ser mais semelhante ao *B. mycoides* do que ao *B. thuringiensis* (O' DONNELL *et al.*, 1980).

O *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) classifica o B.t. em diferentes subespécies de acordo com os testes de sorologia do antígeno flagelar H. Esta técnica tem revelado distinção das variedades tanto do *B. thuringiensis* (DE BARJAC & FRACHON, 1990) como do *B. sphaericus* (DE BARJAC *et al.*, 1985). Porém, muitas vezes torna-se difícil a obtenção dos antisoros para a análise de taxonomia, além da pouca informação sobre a patogenicidade diante do espectro diversificado de larvas de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros). Não há também correspondência entre a sorologia e a atividade patogênica. DULMAGE, citado por MEADOWS *et al.* (1992) classificaram aproximadamente 320 linhagens de B.t. de acordo com a atividade inseticida. Embora os resultados tenham revelado certa

correlação com os testes de sorologia, algumas subespécies de mesmo sorotipo apresentaram δ -endotoxina diferentes. As subespécies *tenebrioni* e *san diego* diferem da *morrisoni* quanto a patogenicidade a larvas de coleópteros, mas possuem o mesmo sorotipo H8a, 8b. A subespécie *morrisoni* apresenta toxicidade também a larvas de dípteros (DE BARJAC & FRACHON, 1990).

Novas linhagens de B.t. tem sido descobertas, ampliando o número das subespécies, tornando este tipo de classificação inconveniente na prática. Atualmente, existem 34 subespécies de B.t. classificadas com antígeno flagelar (DE BARJAC & FRACHON, 1990).

Outro critério proposto para classificação de B.t. é através dos perfis de plasmídios. As linhagens de B.t. podem apresentar vários tipos de plasmídios (CARLTON & GONZÁLEZ, 1985). Porém, este tipo de análise apresenta a mesma deficiência que a sorologia do antígeno flagelar H com respeito a atividade inseticida.

A partir de análises de 10 diferentes tipos de cristais de B.t. através de difusão dupla de imunoprecipitação, ELISA e *Western Blotting*, SMITH (1987) sugere que a classificação de B.t. seja feita em apenas 2 grupos de acordo com a atividade larvicida a lepidópteros e a dípteros. De acordo com o mesmo autor a análise sorológica dos cristais não é capaz de determinar a toxicidade a nível de gênero dos insetos sendo possível apenas a nível de ordem.

Como a maioria dos genes dos cristais protéicos é codificada nos plasmídios, estes podem ser transferidos a outras linhagens, gerando um novo tipo de toxina pela presença de dois ou mais genes diferentes da toxina. O plasmídio que codifica o cristal pode ser transmitido do *B. thuringiensis* a outras subespécies do próprio B.t. como a outra espécie como *B. cereus* por conjugação (GONZÁLEZ JR. *et al.*, 1982). Além disto, estes estão frequentemente associados com elementos transponíveis (ARONSON *et al.*, 1986), o que pode causar a falta de correlação entre o sorotipo e o tipo da toxina previamente existente em uma dada linhagem. Portanto, a tendência atual é classificar os B.t. com base na estrutura dos genes (HÖFTE & WHITELEY, 1989) e no perfil da patogenicidade (KNOWLES & ELLAR, 1988).

O emprego de técnicas moleculares em taxonomia está conduzindo a uma maior rapidez e confiabilidade nos resultados permitindo uma classificação mais segura. As linhagens de *B. anthracis* e *B. cereus* apresentaram mesma sequência de 16S rRNA. Houve pequenas diferenças na sequência entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* que podem ser atribuídas como variação intraespécies (ASH *et al.*, 1991).

BOURQUE *et al.* (1993) propõem o método baseado em reação em cadeia da polimerase (PCR) para rápida identificação de linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e a diferenciação de linhagens desta subespécie. Os *primers* utilizados foram oligonucleotídeos de genes de *cryIA(a)*, *cryIA(b)* e *cryIA(c)*. A reação em cadeia da polimerase de DNA alvo foi feito simultaneamente com os 3 conjuntos de *primers*. Através desta técnica os genes *cryIA(a)* e *cryIA(c)* das subespécies *galleriae* e *alesti* puderam ser amplificados enquanto que *entomocidus* e *kenyae* foram amplicados apenas o *cryIA(a)* e *cryIA(b)* respectivamente. Como era de se esperar, as linhagens de *B. anthracis*, *B. cereus*, B.t.i. e B.t.t. não apresentaram nenhuma amplificação de PCR.

Recentemente, BROUSSEAU *et al.* (1993) diferenciaram as 33 subespécies de B.t. e 2 de *B. cereus* através de reação em cadeia da polimerase. A partir de 120 *primers*, foram escolhidos 3 *primers* com 9 bases para identificação de linhagens de B.t. comercial e a diferenciação de linhagens de *B. cereus*. As duas linhagens de *B. cereus* foram também distintas entre si.

5. Toxina dos *Bacillus* entomopatogênicos

A atividade tóxica do *Bacillus thuringiensis* se deve principalmente ao cristal protéico, denominado de δ -endotoxina de 27 a 140 kD, produzido a partir da segunda fase da esporulação (BULLA JR. *et al.*, 1980; HÖFTE & WHITEKEY, 1989). Em adição ao δ -endotoxina, B. t. pode produzir várias outras substâncias tóxicas como β -exotoxina (LECADET & DE BARJAC, citado por HÖFTE & WHITELEY, 1989), fosfolipase e protease chamada inibidor imuno A (InA), tóxica a larvas de lepidópteros e dípteros (LÖVGREN *et al.*, 1990).

Em geral, o cristal de cada linhagem de B.t. consiste de várias proteínas que proporcionam diferentes espectro inseticida (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

A maioria dos cristais protéicos é denominada de protoxina por apresentar toxicidade a larvas de insetos apenas quando convertida em polipeptídeos pequenos através da proteólise no intestino do inseto. A síntese da protoxina corresponde 33 a 43% do total da síntese de proteína e compreende aproximadamente 20-30% do peso das células esporuladas (CALABRESE *et al.*, 1980).

Baseando na atividade biológica de linhagens de B.t. ELLAR *et al.* (1986) dividiu em 5 patotipos: (1) tóxicas a lepidópteros, (2) tóxicas a dípteros, (3) tóxicas a coleópteros, (4) tóxicas a dípteros e lepidópteros e (5) não tóxica.

As linhagens altamente tóxicas a lepidópteros, apresentam a protoxina como uma ou mais proteínas de 130-160 kD (TYRELL *et al.*, 1981). A protoxina pode sofrer clivagem proteolítica, *in vitro* ou no intestino larval, produzindo polipeptídeos de 30 a 80 kD que são citolíticos em culturas de células e tóxicos as larvas de lepidópteros (HUBER *et al.*, 1981).

As proteínas CryIVA e CryIVB da subespécie *israelensis* são também convertidas a fragmentos tóxicos de 53 kD (CHILCOTT & ELLAR, 1988) ou 68-78 kD (CHUNGJATUPORNCHAI *et al.*, 1988) por enzimas proteolíticas do intestino das larvas (*Anopheles* e *Culex*) (PRIEST, 1992). O cristal CryIVC corresponde à proteína de 130-kD (THORNE *et al.*, 1986). O cristal CryIVD de 72-kD, citado freqüentemente na literatura como 65 kD, é convertido a fragmentos de 30-35 kD, que são ativas contra uma variedade de dípteros (CHILCOTT & ELLAR, 1988).

O número, forma, composição do cristal pode variar conforme o tipo da subespécie (NORRIS, 1970; ARONSON *et al.*, 1986).

Normalmente, a subespécie *israelensis* apresenta de 2 a 4 inclusões cristalinas por célula cuja forma varia de cubóide a bipiramidal, ovóide ou amorfo (CHARLES & DE BARJAC, 1982; MIKKOLA *et al.*, 1982 e YAMAMOTO *et al.*, 1983). Composição similar do complexo protéico foi observado na subespécie *morrisoni* (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Estas proteínas apresentam propriedades inseticidas aos dípteros (GOLBERG & MARGALIT, 1977; MARGALIT & DEAN, 1985; PRIEST, 1992) acarretando atividades hemolíticas a eritrócitos e citolíticas a culturas de células de mosquitos (THOMAS & ELLAR, 1983; CHILCOTT *et al.*, 1984; LAURENT & CHARLES, 1984).

FEITELSON *et al.* (1992) sugeriram a inclusão das proteínas CryV e CryVI, ativas em nematóides, para análise de similaridade de 29 tipos de proteínas de B.t. previamente classificada por HÖFTE & WHITELEY (1989) (Figura 1).

Linhagens com proteína CryI de peso molecular de 130 kD e forma bipiramidal, acarretam toxicidade às larvas de lepidópteros. O gene *cryIIIA* observado nas subespécies *tenebrionis* e *san diego* sintetiza um cristal de forma rombóide com 72 kD (CryIII), que confere patogenicidade aos coleópteros.

As proteínas (71 kD) do gene *cryIIA* e do *cryIIB* possuem alta homologia entre si (88%). Porém estas proteínas, CryIIA e CryIIB, revelam espectro de atuação inseticida diferente para certos lepidópteros e dípteros. A proteína CryIIB apresentou o dobro de toxicidade da proteína CryIIA para *Heliothis zea* enquanto a proteína CryIIA foi 6 vezes mais tóxica do que a CryIIB para *Ostrinia nubilalis*. A atividade larvicida de *Aedes aegypti* foi constatada apenas com CryIIA (DANKOCSIK *et al.*, 1990).

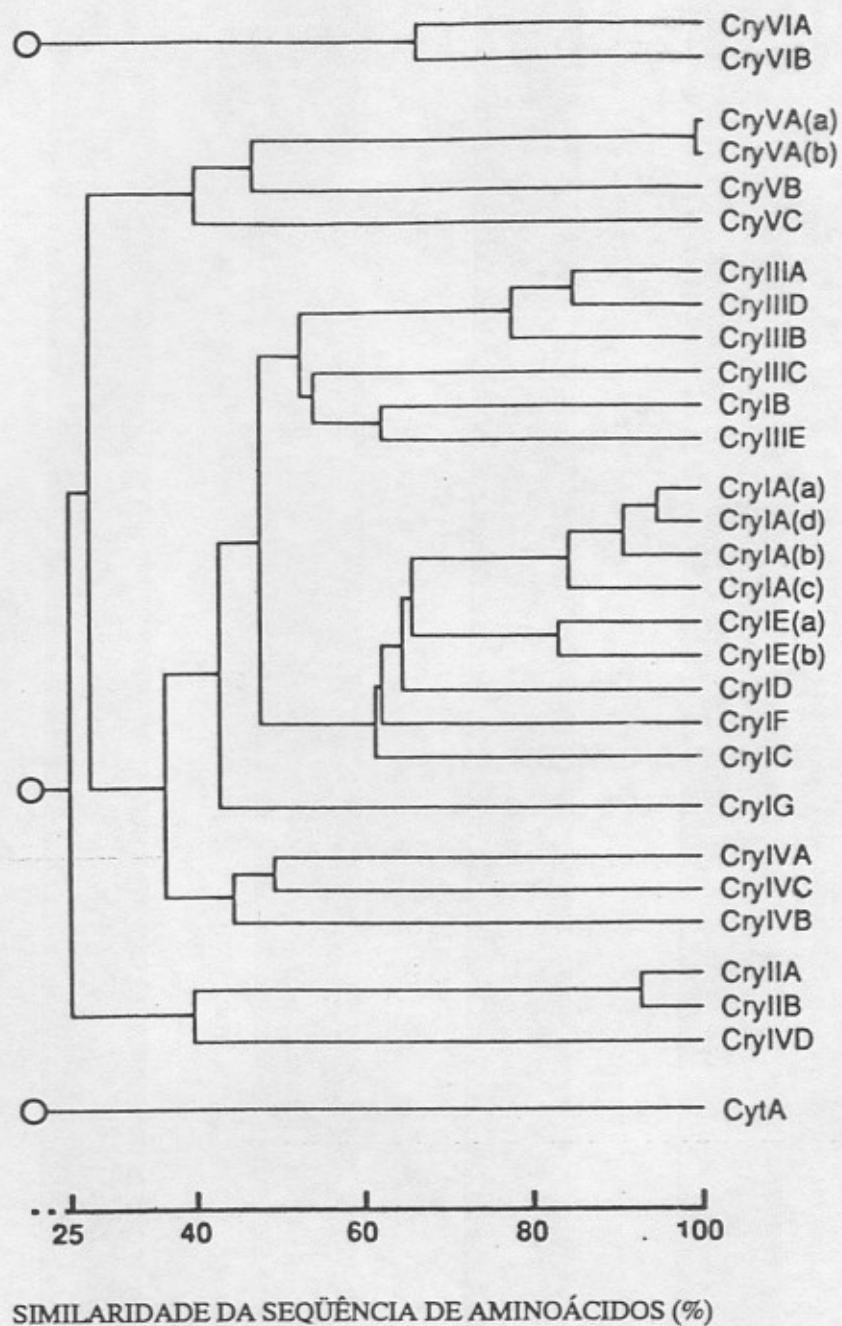


Figura 1. Porcentagem de similaridade de 29 tipos de proteínas de *B. thuringiensis* (FEITELSON *et al.*, 1992).

Já o cristal da subespécie *israelensis* consiste de várias proteínas de 135 (CryIVA), 128 (CryIVB), 78 (CryIVC), 72 (CryIVD) e 27 kD (CytA) correspondentes aos genes *cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVC*, *cryIVD* e *cytA*, respectivamente. Esta última proteína não apresenta nenhuma sequência homóloga com outras proteínas do cristal. Ao invés de CytA apresentar toxicidade específica, ela apresenta atividade citolítica (THOMAS & ELLAR, 1983). Embora estas proteínas sejam os principais compostos que acarretam toxicidade aos mosquitos, nenhuma delas apresenta alta toxidez isoladamente em relação ao complexo total do cristal (PRIEST, 1992).

Acredita-se que haja sinergismo entre a proteína CryIV com a de 27 kD (CytA) (CHANG *et al.*, 1993). O mesmo não ocorreu entre as proteínas CryIV (TABASHNIK, 1992). CHILCOTT & ELLAR (1988) observaram alta toxicidade a *Ae. aegypti* quando a proporção de proteínas 27 e 65 kD foi de 0,75/1,0 (p/p).

A proteína 27 kD apresenta-se mais abundante no cristal (THOMAS & ELLAR, 1983). Quando processada a 25 kD apresenta baixa atividade larvicida quando comparada com a original (PRIEST, 1992).

Em alguns casos, há correlação entre a estrutura da toxina observada pela sequência de aminoácidos e atividade toxigênica. Dentre a classe da proteína CryI, apenas CryIB e CryIG não apresentam boa correlação entre si. No entanto, o CryIB apresenta 53% de homologia com a sequência de aminoácidos do CryIII. Outro caso de diferenciação é o CryIVD que apresenta maior similaridade com CryII.

As proteínas CryIIIA (subespécies *morrisoni* e *tenebrionis*) e CryIIIB (subespécies *tolworthi* e *pakistani*) (LAMBERT *et al.*, 1992), ambas tóxicas a larvas de besouros de batata Colorado, apresentam 69 % de homologia (DONOVAN *et al.*, 1992).

Em geral, as toxinas do *B. thuringiensis* são instáveis no meio ambiente (MARGALIT & DEAN, 1985; PUSZTAI *et al.*, 1991) e podem ser degradadas após 48 horas (CRUEGER & CRUEGER, 1984). Assim, a aplicação do produto deve ser repetida regularmente, encarecendo o processo de combate aos insetos. No entanto, a carcaça de larvas de *Ae. aegypti* previamente mortas pelo B.t.i., pode propiciar a sua multiplicação com recursos de fontes orgânicas do *habitat* natural (KHAWALED *et al.*, 1990). O B.t.i. pode apresentar ciclo de crescimento completo (germinação, crescimento vegetativo e esporulação) nas larvas de *Ae. aegypti* (KHAWALED *et al.*, 1990) e *Culex quinquefasciatus* e *An. maculatus* (PANTUWATANA & SATTABONGKOT, 1990).

Já a toxina do *B. sphaericus* resistiu a mais de 9 meses (SINGER, 1980) em água com matéria orgânica rica fornecendo um produto semi-permanente para o controle de larvas de mosquito (KALFON *et al.*, 1986).

Inicialmente, a proteína do cristal do *B. sphaericus* 2297 e 2362 tem peso molecular de 125 kD. Durante a esporulação, os cristais com 48 horas se degradam a peptídeos menores, 110, 63 e 43 kD. Apenas os de 110 e 43 kD, apresentam atividade toxigênica a larvas de *Culex pipiens* (BAUMANN *et al.*, 1988). O peptídeo 43 kD tem também efeito tóxico ao *Culex quinquefasciatus* (BROADWELL & BAUMANN, 1986). Contudo na degradação das proteínas dos cristais das linhagens patogênicas, 1593 e 1691, não foram detectadas as bandas 43 e 63 kD (BAUMANN *et al.*, 1985).

As proteases do intestino do inseto convertem o peptídeo de 43 kD a 40 kD, amplificando cerca de 54 vezes a toxicidade aos tecidos das células do *Culex quinquefasciatus* (BAUMANN *et al.*, 1985). Este peptídeo, 40 kD, constitui-se de vários aminoácidos hidrofóbicos (BAUMANN *et al.*, 1987). Os autores sugerem que a alta hidrofobicidade destes peptídeos está envolvido com as interações da membrana do epitélio intestinal da larva.

Enquanto a parte tóxica da proteína do *B. sphaericus* consiste na porção terminal -C, a protoxina do *B. thuringiensis* específica para lepidópteros indica a porção terminal -N (BROADWELL *et al.*, 1990). Embora a metade do terminal -C da protoxina de B.t. não seja requerida na atividade tóxica, esta porção é altamente conservada entre as protoxinas produzidas pelos vários B.t. (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

6. Genes toxigênicos de *Bacillus thuringiensis*

Os genes da proteína do cristal do B.t. encontram-se distribuídos em um ou mais plasmídios de tamanho entre 45 a valores superiores a 225 kb (KRONSTAD *et al.*, 1983) e no cromossomo de algumas linhagens (KRONSTAD *et al.*, 1983).

GONZÁLEZ JR. *et al.* (1981) compararam os perfis plasmidiais de 5 subespécies de B.t. que produzem δ -endotoxina (Cry⁺) e seus respectivos mutantes acristalinos (Cry⁻). A perda dos seguintes plasmídios 130, 105, 75, 50 e 29 mD nas respectivas linhagens mutantes Cry⁻ de B.t. HD-8, HD-4, HD-2, HD-73 e HD-1 sugerem o envolvimento destes plasmídios com a produção do cristal.

Dentre os vários genes de diversas subespécies de B.t. que codificam a proteína do cristal já isolados cita-se o *kurstaki* HD-1-Dipel (SCHNEPF & WHITELEY, 1981), *thuringiensis* HD-1 (HELD *et al.*, 1982 e WHITELEY *et al.*, 1984), *thuringiensis berliner* 1715 (KLIER *et al.*, 1982), *kurstaki* HD-73 (KRONSTAD & WHITELEY, 1986; ADANG *et al.*, 1985), *sotto* (SHIBANO *et al.*, 1985), *aizawai* (KLIER *et al.*, 1985), *israelensis* (SEKAR & CARLTON,

1985; CASTRO, 1990), *tenebrionis* (SEKAR *et al.*, 1987), *tolworthi* (SICK *et al.*, 1990) e *san diego* (HERRNSTADT *et al.*, 1987).

Segundo HÖFTE *et al.* (1986) os genes dos cristais de várias linhagens de B.t. podem ter sido recombinados por homologia acarretando toxinas com estruturas e propriedades funcionais diferentes.

A partir de 42 genes de proteína de B.t., HÖFTE & WHITELEY (1989) classificaram 13 diferentes tipos de genes com base na sequência de aminoácidos e o espectro do hospedeiro. Os genes toxigênicos foram agrupados em cinco classes a saber: (1) *cryI* e *cryIIB* específico a lepidópteros, (2) *cryIIA* específico a lepidópteros e dípteros, (3) genes *cryIII* específico a coleópteros, (4) *cryIV* específico a dípteros e (5) *cyt* citolítica a várias células de invertebrados e vertebrados. A atividade bioinseticida da última classe citada não está ainda bem esclarecida.

O cristal de B.t.i. consiste de várias proteínas de 135, 128, 78, 72 e 27-kD correspondentes aos genes *cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVC*, *cryIVD* e *cytA*, respectivamente. Todos estes genes residem no plasmídeo 72-mD (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Através da clonagem do gene toxigênico de B.t.i. no vetor pBC16 de *B. megaterium* VT1650 e a utilização deste produto pVB131 como sonda molecular, SEKAR & CARLTON (1985) concluíram que o plasmídeo 112-kb (ou 72-mD) do B.t.i. está associado com produção da toxina do cristal. Os genes *cryIVA* e *cryIVB* apresentam alta similaridade com os genes *cryI* de lepidópteros.

KRONSTAD & WHITELEY (1986) compararam 20 linhagens da subespécie *kurstaki* e 4 da *thuringiensis* mediante 4 tipos de recombinantes de *E. coli*. Os genes clonados continham os seguintes fragmentos de *HindIII* toxigênicos a larvas de tabaco: 4,5 kb referente ao *kurstaki* HD-1-Dipel, 6,6 kb do *kurstaki* HD-73 e 5,3 kb do *kurstaki* e do *thuringiensis* HD-2. As linhagens testadas revelaram a existência de 1, 2 ou 3 classes de genes homólogos. Através de *imunoblotting* foi constatado que os genes da classe 4,5 e 6,6 kb codificam os polipeptídeos de peso molecular 133,5 e 133,3 kD respectivamente e o de 5,3 kb sintetiza polipeptídeo de aproximadamente 130 kD.

Posteriormente, PREFONTAINE *et al.* (1987) testaram 15 linhagens de B.t. com 5 sondas de oligonucleotídeos (4,5 kb provenientes de HD-1, 5,3 kb do NRD-12 e 6,6 kb do HD-73). Apenas a subespécie *thompsoni* não hibridizou com nenhuma sonda. As subespécies *dendrolimus* e *sotto* apresentaram hibridização semelhantes enquanto que a *subtoxicus* e *entomocidus* revelaram ser diferentes, embora apresentem a mesma esterase e superfície antigênica.

HÖFTE & WHITELEY (1989) sugeriram a denominação de *cryIA(a)*, *cryIa(b)* e *cryIA(c)* aos correspondentes genes de 4,5; 5,3 e 6,6 kb respectivamente. O gene *cryIA(c)* da subespécie *kenyae* apresenta 99 % de homologia com o *cryIA(c)* da subespécie *kurstaki* (VON TERSCH *et al.*, 1991).

VISSER (1988) testou 25 linhagens de B.t. com 4 sondas de DNA do *B.t. entomocidus*. Algumas linhagens não apresentaram hibridização com estas sondas indicando a existência de outros genes.

Recentemente foi comprovado que dois outros genes que codificam proteínas de 34 e 40 kD da subespécie *thompsoni* apresentaram toxicidade a lepidópteras e envolvimento na estrutura do cristal respectivamente (BROWN & WHITELEY, 1992). LAMBERT *et al.* (1992) isolaram também um novo gene (*cryIIIC*) que codifica cristal toxigênico a larvas de coleópteras. O cristal CryIIIC que não é tóxico na sua forma natural, torna-se altamente tóxico a besouros de batatas Colorado após tratamento com tripsina. A homologia com demais toxinas CryIIIA, CryIIIB e CryIIID foi de 37, 32 e 37 % respectivamente.

Outro gene (*cryIIIB2*) foi descoberto em *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* por DONOVAN *et al.* (1992) com patogenicidade a larva de milho (*Diabrotica undecimpunctata howardi*).

7. Modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis*

A morte das larvas pode ser resultante da intoxicação ou septicemia após a ingestão dos esporos e dos cristais (ARONSON *et al.*, 1986). Durante o processo de esporulação do *Bacillus thuringiensis* pode haver concomitantemente a produção de inclusões cristalinas protéicas, que pode ser letal a vários insetos. A eficiência de uma toxina em particular é dependente da solubilidade do cristal, atuação proteolítica na protoxina e a afinidade deste com os receptores disponíveis no intestino das larvas (ARONSON *et al.*, 1991).

O cristal, com massa molecular de cerca de 130 kD (HUBER *et al.*, 1981) denominada de protoxina por não apresentar toxicidade de imediato, passa pelo estômago das larvas sem se modificar no meio ácido. Porém, em meio alcalino como no intestino médio de muitos lepidópteros, ocorre a clivagem do cristal pela proteólise resultando em moléculas menores (peptídeos de peso molecular de 65 a 85 kD). Estas toxinas interagem com as células do epitélio do intestino das larvas de insetos susceptíveis. Análises fisiológicas por eletroforese (HARVEY *et al.*, 1983) e análises bioquímicas (KNOWLES & ELLAR, 1987) indicam que as toxinas

induzem a formação de pequenos poros na membrana das células acarretando distúrbio no balanço osmótico. Conseqüentemente, as células do tecido epitelial do intestino incham até a lise. A larva pára de se alimentar, levando à morte.

Vários fatores em conjunto podem proporcionar o grau de especificidade inseticida. A eficiência da solubilização do cristal e ativação proteolítica nas proteínas do cristal no intestino das larvas co-determinam a especificidade destas pela alta afinidade aos sítios de ligação das células do epitélio intestinal. O nível de toxicidade parece estar correlacionado com a concentração e/ou afinidade de tais sítios de ligação (HOFMANN *et al.*, 1988).

HONÉE *et al.* (1991) sugerem que embora a ação tóxica seja a parte terminal -N da proteína do cristal de B.t.; a parte terminal -C determina as ligações específicas com os receptores da membrana do intestino das larvas. A região terminal -N é hidrofóbica enquanto que a região do terminal -C é hidrofílica (SCHNEPF *et al.*, 1985).

8. Aplicação comercial do B.t.

Os produtos de B.t. representam 90-95 % do mercado total de bioinseticidas. O crescimento da produção de B.t. aumentou quase que 5 vezes neste últimos 9 anos. O valor de comercialização de bioinseticidas que foi de U\$ 24 milhões em 1980 passou para U\$ 107 milhões em 1989. O crescimento anual da produção de B.t. previsto é de 11 % até que se atinja U\$ 300 milhões em 1999 (BOWEN, citado por FEITELSON *et al.*, 1992). Entretanto, de acordo com HACKING (citado por HARWOOD, 1989) a produção de bioinseticida nos Estados Unidos ainda é muito pequena (U\$10 milhões/ano) em relação aos produtos químicos (U\$ 13 bilhões).

São aplicados 10-50 gramas do produto por acre ou cerca de 10^{20} moléculas por acre. Em termos de potência molecular, a toxina de B.t. é mais ativa quando comparada com outros pesticidas (300 vezes mais ativo que o piretróide, que deve ser aplicado na concentração de $3 \cdot 10^{22}$ moléculas por acre ou 80.000 vezes mais que os organofosfatos na qual se aplica cerca de $8 \cdot 10^{24}$ moléculas por acre) (FEITELSON *et al.*, 1992).

9. Desenvolvimentos recentes na triagem, melhoramento e aplicação de *Bacillus* entomopatogênicos

No campo de triagem de B.t., CAROZZI *et al.* (1991) utilizaram sondas moleculares específicas a dípteros, lepidópteros e coleópteros. As sondas moleculares foram obtidas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com 12 tipos de *primers* de oligonucleotídeos de δ -endotoxina dos genes: *cryIA*, *cryIIIA*, *cryIIIB*, *cryIVA* e *cryIVB*. Estes codificam as proteínas patogênicas a lepidópteros (*CryIA*), coleópteros (*CryIIIA* e *CryIIIB*) e dípteros (*CryIVA* e *CryIVB*). Esta técnica pode oferecer maior rapidez em relação a outros métodos de triagem como hibridização de DNA, ELISA e bioensaio de insetos. Porém, a triagem de nova toxina de B.t. pode ser ocultado, caso esteja em região diferente dos *primers* escolhidos.

Vários genes toxigênicos foram clonados em outras linhagens como *Escherichia coli* (CASTRO, 1990), *B. subtilis* (THORNE *et al.*, 1986), *B. megaterium* (SEKAR & CARLTON, 1985) e bactérias endófitas associadas a plantas de interesse (OBUKOWICZ *et al.*, 1986).

Atualmente, novas linhagens apresentando toxicidade múltipla tem sido obtidas por transdução e transformação. O gene *cryIIIA* (tóxico a Coleópteros) tem sido introduzido em subespécies de B.t. patogênicas a lepidópteros (*entomocidus* e *aizawai*) e dípteros (*israelensis*) por eletrotransformação (LECADET *et al.*, 1992).

O *Bacillus sphaericus* 2362 tem aumentado a ação toxigênica a larvas de *Aedes* em aproximadamente dez vezes em relação a linhagem parental com a introdução do gene δ -endotoxina de B.t.i. (BAR *et al.*, 1991).

O uso de B.t.i. como bioinseticida pode apresentar pelo menos duas dificuldades: (1) a proteína CytA do B.t.i. apresenta atividade hemolítica e citolítica em células de mamíferos (THOMAS & ELLAR, 1983) e (2) como o B.t.i. não é competidor natural em meio aquático, seu tempo de vida fica comprometido. Além do mais, após a aplicação do B.t.i. em lagos, os esporos podem afundar rapidamente, deixando o local onde as larvas se alimentam. Visando solucionar estes problemas, MURPHY & STEVENS JR. (1992) introduziram o gene *cryIVD* de B.t.i. em cianobactéria (*Agmenellum quadruplicatum*). A expressão do gene *cryIVD* de B.t.i. em cianobactéria foi suficientemente bem sucedida para matar as larvas de *Culex pipiens* e *Ae. aegypti*.

A clonagem do gene δ -endotoxina de B.t. tem sido realizada em plantas como algodão, batata, tabaco, tomate, etc visando a resistência a pragas de insetos danificadores (BARTON *et al.*, 1987; FISCHHOFF *et al.*, 1987; VAECK *et al.*, 1987).

MATERIAL & MÉTODOS

1. Isolamento de bactérias aeróbias e formadoras de endosporos

O isolamento de linhagens foi feito a partir de solos de diferentes regiões do Brasil (Tabela 3). Após a secagem do solo a temperatura ambiente, amostras de 10 g foram suspensas em 90 mL de água e homogeneizadas. Em seguida, esta suspensão foi tratada termicamente a 80 °C por 10 minutos, diluídas em água e plaqueadas de forma a obter entre 30-300 unidades formadoras de colônias (UFC) em ágar nutriente acrescido com extrato de levedura 0,3 % (NY) após a incubação a 30 °C por 24 horas (*Institut Pasteur*). As colônias (Tabela 1) foram transferidas para placas de ágar NY e incubadas a 30 °C por 7 dias com a finalidade de induzir a esporulação para o teste de atividade larvívora de *Aedes fluviatilis*.

2. Teste de Entomopatogenicidade

2. 1. Criação do mosquito *Aedes fluviatilis*

As larvas foram fornecidas pelo Centro de Pesquisas Pluridisciplinar Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. A criação dos mosquitos foi feita conforme descrito por CASTRO (1990).

Os mosquitos no estágio adulto foram colocados na gaiola (armação de ferro 40x35x35 cm envolta com tela) contendo recipiente com solução aquosa de açúcar para a alimentação dos mosquitos machos. Foi também, colocado na gaiola um funil com papel de filtro imerso em um recipiente de plástico com água de forma a mantê-lo sempre úmido para a deposição de ovos. Os ovos foram transferidos para recipientes de plástico com profundidade máxima de água de 4 cm. Os diferentes estádios de desenvolvimento larval foram separados em recipientes correspondentes. Como as larvas de *Aedes* se desenvolvem preferencialmente em água limpa, foi renovada a água dos recipientes contendo larvas periodicamente (3 vezes por semana) a fim de evitar o desenvolvimento de microrganismos e protozoários indesejáveis.

Tabela 3. Designação dos isolados procedentes de amostras de solos.

designação do isolado	procedência de solo	n° de amostras coletadas
0-53	Serra do Japi (SP)	4
54-101	Catanduva (SP)	3
102-191	Mata Santa Genebra (SP)	5
192-247	Manaus (AM)	7
248-272	Pantanal (MS)	4
273-285	Serra do Japi (SP)	1
286-311	Itatiaia (RJ)	2
312-350	Pantanal (MS)	4
351-446	Serra da Juréia (SP)	10
447-500	Birigui (SP)	3
501-581	Pirassununga (SP)	5
582-623	Serra da Juréia (SP)	5
624-650	Curitiba (SP)	2
651-685	Serra do Mar (SP)	4
686-708	Birigui (SP)	1
709-735 ⁽¹⁾	UNICAMP	-
736-741	Serra da Juréia (SP)	1
742-790	Birigui (SP)	3
791-820	Porto Belo (SC)	1
821-840	Bombinhas (SC)	1
841-860	Aeroporto Cuciú (AM)	1
861-900	Cabana Ianomani (AM)	1
901-940	Maturaca (AM)	1
941-950	São Gabriel da Cachoeira (AM)	1
951-970	Maturaca (AM)	1
971-973 ⁽²⁾	Mata Santa Genebra (SP)	
974 ⁽³⁾	UNICAMP	
975-978 ⁽⁴⁾	Serra da Juréia (SP)	1
979 ⁽⁵⁾	Serra da Juréia (SP)	
980 ⁽⁶⁾	VIPSU (E.U.A.)	

(1), linhagens de referência de *Bacillus thuringiensis*; (2), linhagens isoladas pelo Edilberto Portugal Princi (CPQBA); (3), linhagem cedida pela Prof. Dra. Yoko Bomura Rosato; (4), linhagens isoladas pela Paula Von Zuben; (5), linhagem isolada pela Tânia Guaycurús (FIOCRUZ); (6), linhagem recebida pelo Prof. Dr. Allan A. Yousten, *Virginia Polytechnic Institute and State University* (VIPSU), E.U.A.

3. Linhagens de *Bacillus* utilizadas

As linhagens de referência utilizadas nos testes de caracterização, identificação e classificação das bactérias entomopatogênicas foram *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. cereus* subsp. *mycoides*, *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*. As designações e procedência destas linhagens de referência e das linhagens resultantes da seleção estão indicadas na Tabela 4.

As linhagens foram mantidas em caldo nutriente com glicerol 20 % a -20 °C (PRIEST *et al.*, 1989), ágar nutriente inclinado a 4 °C e sob a forma liofilizada. A produção de cristal das linhagens foi rotineiramente monitorada por microscopia de contraste de fase.

4. Caracterização, identificação e classificação

Para a caracterização, identificação e classificação das linhagens indicadas na Tabela 4 foram utilizados testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, assim como técnicas de eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) e hibridização com sondas moleculares.

4. 1. Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos

Para caracterização microscópica, bioquímica e fisiológica foi utilizado o método de replicação em placas (CANHOS, 1980) adaptado para replicação em tubos (GALLO, 1989a) e de acordo com a metodologia descrita por GORDON *et al.* (1973); PRIEST (1989); PRIEST & YOUSTEN (1991); CASTRO (1990). Os meios de cultura, soluções e reagentes utilizados para a caracterização e identificação dos isolados encontram-se descritos no apêndice e sumarizados na Tabela 5. Os testes realizados foram: exame da morfologia das colônias, células, esporos, esporângio e cristal, reação *Gram*, catalase, oxidativo/fermentativo, *Voges Proskauer*, crescimento na presença de lisozima 0,001 %, produção de ácido a partir de D-glicose, L-arabinose, celobiose, galactose e D-xilose, hidrólise de amido, caseína, redução de nitrato a nitrito, presença de urease e hemólise.

Tabela 4. Procedência das linhagens de *Bacillus*

nº	linhagens	designação	origem/procedência
1	<i>B. anthracis</i>	BA1	P. C. B. Turnbull
2	<i>B. anthracis</i>	BA6	P. C. B. Turnbull
3	<i>B. anthracis</i>	BA68	P. C. B. Turnbull
4	<i>B. anthracis</i>	BA69	P. C. B. Turnbull
5	<i>B. cereus</i>	DSM31	F. G. Priest
6	<i>B. cereus</i>	S68	(arroz) F. G. Priest
7	<i>B. cereus</i>	S71	(arroz) F. G. Priest
8	<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycoides</i>	S83	F. G. Priest
9	<i>B. sphaericus</i>	2362	A. A. Yousten
10	<i>B. sphaericus</i>	31	A. A. Yousten
11	<i>B. sphaericus</i>	SSII-1	A. A. Yousten
12	<i>B. sphaericus</i>	ATCC14577	Coleção de Cultura Tropical
13	<i>B. subtilis</i>	S31	F. G. Priest
14	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	S476	F. G. Priest
15	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	S477	F. G. Priest
16	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	T7002	Institut Pasteur
17	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>	S332	F. G. Priest
18	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>	T3001	Institut Pasteur
19	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i>	S331	F. G. Priest
20	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>dendrolimus</i>	S469	F. G. Priest
21	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>dendrolimus</i>	T4A001	Institut Pasteur
22	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>	S474	F. G. Priest
23	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>	T5001	Institut Pasteur
24	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>	T5002	Institut Pasteur
25	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	IPS82	E. P. Portugal
26	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	CCT2221	A. A. Yousten
27	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	HD-1	Y. B. Rosato
28	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	HD-73	Y. B. Rosato
29	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	S466	F. G. Priest
30	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	S467	F. G. Priest
31	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	T3A002	Institut Pasteur

(continuação da Tabela 4)

nº	linhagens	designação	origem/procedência
32	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	T8001	<i>Institut Pasteur</i>
33	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	T8002	<i>Institut Pasteur</i>
34	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i>	S468	F. G. Priest
35	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i>	T4001	<i>Institut Pasteur</i>
36	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>subtoxicus</i>	T6002	<i>Institut Pasteur</i>
37	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>		C. F. S. Andrade
38	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	S336	F. G. Priest
39	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	S337	F. G. Priest
40	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	S461	F. G. Priest
41	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>	S478	<i>Institut Pasteur</i>
42	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>	T9001	<i>Institut Pasteur</i>
43	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>	T9002	<i>Institut Pasteur</i>
44	isolado 275	CCT2341	solo
45	isolado 276	CCT2343	solo
46	isolado 287	CCT2257	solo
47	isolado 288	CCT2342	solo
48	isolado 291	CCT2258	solo
49	isolado 574	CCT2338	solo
50	isolado 976	CCT2259	solo
51	isolado 977	CCT2260	solo
52	isolado 978	CCT2261	solo
53	isolado A.3.3	CCT2344	solo (E. P. Portugal)
54	isolado A.3.5 branco	CCT2339	solo (E. P. Portugal)
55	isolado A.3.5 rosa	CCT2340	solo (E. P. Portugal)
56	isolado MTP-2	CCT2264	Y. B. Rosato
57	isolado B.t.m.	CCT2265	T. Guaycurus
58	isolado ZOOCAMP	CCT0434	(inseto) C. F. S. Andrade

Tabela 5. Relação dos testes para caracterização e identificação dos isolados segundo GORDON *et al.* (1973)⁽¹⁾; PRIEST (1989a)⁽²⁾; CASTRO (1990)⁽³⁾ e PRIEST & YOSTEN (1991)⁽⁴⁾.

teste	meio de cultura	soluções/reagentes
morfológico ⁽¹⁾	ágar nutriente	cristal violeta, iodo <i>Lugol</i> e safranina-o verde malaquita e safranina-o água oxigenada 3 %
motilidade ⁽¹⁾	ágar nutriente	
reação <i>Gram</i> ⁽¹⁾	ágar nutriente	
esporos ⁽¹⁾	ágar nutriente	
catalase ⁽¹⁾	ágar nutriente	
produção de ácidos ⁽²⁾	meio de fermentação	glicose, arabinose, celobiose, galactose e xilose (concentração de açúcar final 0,5 %)
hidrólise de amido ⁽¹⁾	ágar nutriente com amido 1%	solução de iodo <i>Lugol</i> leite desnatado <i>Molico</i>
hidrólise da caseína ⁽¹⁾	ágar nutriente	
crescimento em NaCl	caldo nutriente com NaCl 7 e 10 %	lisozima 0,1 % em HCl 0,01 N (estoque)
crescimento em pH 5,7	ágar /caldo de dextrose <i>Sabouraud</i>	
tolerância a lisozima 0,001 % ⁽¹⁾	caldo nutriente com lisozima 0,001%	α -naftol 5 % em etanol e NaOH 40 %
oxidativo/fermentativo	meio modificado	
<i>Voges Proskauer</i> ⁽¹⁾	caldo de glicose	
redução de nitrato a nitrito	caldo de nitrato	ácido sulfanílico 0,8 % e ácido acético 5 N e α -naftilamina 0,5 % em ácido acético 5 N
degradação da tirosina	ágar nutriente com L-tirosina 0,5 %	
hemólise ⁽³⁾	ágar nutriente com sangue de carneiro 10 %	
utilização de citrato	meio de citrato de <i>Simmon</i>	
urease	<i>Christensen</i> (Oxoid)	
utilização de adenina ⁽⁴⁾	ágar nutriente com adenina 4 g/l	
fagotipagem ⁽⁴⁾	NYSM	

A sorologia de 15 isolados foi feita no *Institut Pasteur*. Testes adicionais de fagotipagem e utilização de adenina (PRIEST & YOUSTEN, 1991) foram realizados para as linhagens de *B. sphaericus*, incluindo o isolado CCT2261 (Tabela 5). Estas linhagens foram inoculadas em NYSM e incubadas durante a noite à 37 °C. Posteriormente, 0,1 ml da suspensão foi inoculada em 4 ml de NYSM contendo ágar 0,7 % previamente fundido e mantido a 48-50 °C. Esta suspensão foi homogeneizada e imediatamente transferida para placa de Petri contendo ágar NYSM. Após solidificação, 5 µl de cada suspensão de fagos (1A, 63, 4 e 14) foi inoculada na superfície do ágar NYSM com bactérias. Os bacteriófagos foram cedidos pelo Prof. Dr. Allan A. Yousten (*Virginia Polytechnic Institute and State University*, E.U.A.). Após incubação a temperatura ambiente durante a noite, foram observadas a lise ou não das células das bactérias.

4. 2. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares totais

O procedimento da eletroforese de proteínas totais foi feito seguindo recomendações da *Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises* (1990-1991) e JACKMAN (1985).

4. 2. 1. Preparo da amostra

Após o cultivo das bactérias indicadas na Tabela 4 em ágar nutriente, por 48 horas, as células foram coletadas com auxílio de uma lâmina e transferidas para tubo tipo *Eppendorf*. Ressuspendeu-se as células com 1,0 ml da solução tampão de lise (Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 5% e glicerol 10 %), seguido de aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Após o resfriamento da suspensão das células à temperatura ambiente, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C para posterior análise por eletroforese.

4. 2. 2. Preparo dos géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As soluções e reagentes utilizados para o preparo do gel de separação SDS-PAGE 10 % e gel de empacotamento SDS-PAGE 4 % de 1,5 mm de espessura e respectivos volumes estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6. Volume das soluções estoques utilizados no preparo dos géis

solução estoque	gel de separação	gel de empacotamento
acrilamida 29,2 % e bis acrilamida 0,85 %	20,0 ml	2,66 ml
tampão I (Tris-HCl 1,5M pH 8,8)	15,0 ml	---
tampão II (Tris-HCl 0,5M pH 6,8)	---	5,0 ml
água destilada	24,1 ml	12,2 ml
SDS 10 %	600 µl	200 µl
persulfato de amônio 10 %	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Volume calculado para o preparo de 2 géis de separação e 2 géis de empacotamento. Todas as soluções foram estocadas a 4 °C, exceto o persulfato de amônio e o SDS que foram mantidos a -20 °C e a temperatura ambiente, respectivamente. SDS, dodecil sulfato de sódio; TEMED, N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamino, Tris-HCl solução de trizma base com pH ajustado com HCl.

Primeiramente, foi preparado o gel de separação SDS-PAGE 10 % com a adição das soluções na sequência indicada na Tabela 6. As soluções de acrilamida, tampão I e água foram colocadas em *Erlenmeyer* de 125 ml e homogeneizada sob vácuo com a finalidade de exaurir o oxigênio, inibidor da polimerização. Posteriormente, foi acrescentado solução de SDS, o iniciador (persulfato de amônio) e o catalisador da reação (TEMED) na mistura acima. Imediatamente esta foi transferida para o molde das placas de vidro (*Pharmacia*). Em seguida, foi colocado uma barra de *teflon* com a finalidade de delinear uma dimensão reprodutiva do gel e evitar o contato com o oxigênio. Após a polimerização do gel, a barra de *teflon* foi retirada e o espaço remanescente lavado com água destilada.

O gel de empacotamento foi preparado da mesma maneira descrita para o outro gel. A mistura líquida do gel de empacotamento foi despejada sobre o gel de separação e sobre esta uma barra de *teflon* com 10 canaletas para formação de espaços vazios para subsequente aplicação da amostra. A polimerização do gel foi feita à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a retirada da barra de *teflon*, o interior das placas de vidro da parte superior foi lavada com água destilada e solução tampão da cuba de eletroforese (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M e SDS 1 %).

4. 2. 3. Eletroforese de proteínas celulares totais em gel de SDS-PAGE

Após a lavagem das canaletas do gel de empacotamento, estas foram preenchidas com solução tampão da cuba. As placas de vidro contendo os géis foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo a mesma solução tampão acima citada. As amostras foram aplicadas nos géis de empacotamento e dispostas sob corrente de 30 mA até atingirem os géis de separação. A partir daí, a corrente foi de 30 mA para cada gel, até percorrer 10 cm. Os padrões de proteínas de peso molecular (M_r) conhecido foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*: (1) *kit* MW-SDS-70 contendo lisozima (14,3 kD), β lactoglobulina (18,4 kD), tripsinogênio (24,0 kD), pepsina (34,7 kD), albumina de ovo (45 kD) e albumina de plasma bovino (66,0 kD) e (2) *kit* MW-SDS-200 contendo anidrase carbônica (29,0 kD), albumina de ovo (45,0 kD), albumina de plasma bovino (66,0 kD), fosforilase B (97,4 kD), β galactosidase (116 kD) e miosina (205 kD).

4. 2. 4. Coloração de proteínas com nitrato de prata

A visualização das bandas de proteínas foi obtida através da metodologia descrita por BLUM *et al.*, (1987) com algumas modificações (Celso Benedetti, comunicação pessoal).

Após a corrida de eletroforese, o gel foi fixado e revelado através de uma série de etapas em soluções e tempo cronometrados conforme indicado na Tabela 7. Primeiramente, o gel foi fixado com solução de metanol e ácido acético, lavado com etanol, tratado com tiosulfato de sódio, impregnado com solução de nitrato de prata e revelado com solução de carbonato de sódio. Após a revelação, o gel foi tratado com solução de etanol e ácido acético seguida de lavagem com etanol 50%.

Tabela 7. Coloração do gel através da prata

etapas	soluções	tempo
fixação	metanol 50 %, ácido acético 12% e formaldeído 0,019 %	maior ou igual 1 h
lavagem	etanol 50 %	20 min
tratamento	tiosulfato de sódio 2 g/l	1 min ^(*)
lavagem	água	20 seg (3x) ^(*)
impregnação	nitrato de prata 2 g/l	20 min
lavagem	água destilada	20 seg (3x) ^(*)
revelação	carbonato de sódio 6 %, tiosulfato de sódio 4 mg/l e formaldeído 0,019 %	10 min ^(**)
bloqueio	etanol 50 % e ácido acético 18 %	3 min
lavagem	etanol 50 %	maior ou igual 1 h

(*), tempo controlado exatamente para a reprodutividade da revelação das bandas; (**), ou até a visualização desejada das bandas.

A secagem do gel foi realizada entre dois papéis de celofane previamente umedecidos com água à temperatura ambiente.

4. 2. 5. Análise computacional dos géis de SDS-PAGE

Os perfis eletroforéticos das proteínas solúveis totais das células foram examinados através do densitômetro de varredura acoplado com programa de computador PAGETAX 2.00 (JACKMAN, 1985).

A variação entre os géis decorrente das condições do experimento (corrente/voltagem, tempo de corrida, temperatura, etc) foi corrigida baseando-se na amostra de referência. Neste caso, a amostra de referência foi B.t.i. IPS82 aplicada em uma das canaletas de cada gel.

Dados quantitativos de cada perfil de absorbância registrado pelo densitômetro de varredura foi comparada com todos outros perfis separadamente usando o cálculo de coeficiente de similaridade ¹ (r). A matriz foi agrupada pelo método de agrupamento em pares sem

¹ coeficiente de correlação *Pearson Product Moment* ou r:

$$\Sigma^n[(Y_a - \bar{Y}_a)(Y_b - \bar{Y}_b)]$$

$$r_{ab} = \frac{\Sigma^n[(Y_a - \bar{Y}_a)(Y_b - \bar{Y}_b)]}{\sqrt{[\Sigma^n(Y_a - \bar{Y}_a)^2][\Sigma^n(Y_b - \bar{Y}_b)^2]}}$$

onde: Y, valor da absorbância; $\bar{Y}$, valor médio da absorbância e Σ^n , soma de valores de absorbância de 1 para n.

atribuição de peso, usando médias algorítmicas (*unweighted pair group method using averages algorithm*, UPGMA) e indicado em forma de dendrograma.

O cálculo dos pesos moleculares foi estimado através do programa *eletro* (A. Leite, comunicação pessoal) que relaciona $\log M_r$ versus distância de migração (R_f) das proteínas padrão.

4. 3. Estratégia geral utilizada para obtenção de polimorfismos dos fragmentos de restrição (*restriction fragments lenght polymorphisms*, RFLPs)

Os perfis de hibridização com o gene 16S rRNA e com a sonda do gene do cristal 130 kD do B.t.i. foram obtidos conforme o esquema indicado abaixo (Figura 2 e 3) e descritos a seguir.

4. 3. 1. Extração e Purificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos isolados e das linhagens referências foram efetuados de acordo com KRONSTAD *et al.* (1983) e SAMBROOK *et al.* (1989).

O crescimento da bactéria foi feito em *Erlenmeyer* de 500 ml contendo 100 ml do meio de *Spizizen* suplementado com extrato de levedura 0,1 % e glicose 0,5 % (p/v). A incubação foi feita a 37 °C por 4-5 horas (Absorbância até 0,70). As células foram centrifugadas, lavadas com solução I (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,9 e EDTA 10 mM) e suspensas com 1,0 ml de solução II (NaCl 150 mM e EDTA 100 mM, pH 7,9). A lise das células foi feita primeiramente com a adição de lisozima (0.125 mg) e incubação a 37 °C por 20 minutos e posteriormente com adição de 1,25 ml da solução III (Tris-HCl 100 mM, pH 7,9, NaCl 100 mM e SDS 2 %). A incubação procedeu-se a 60 °C até o clareamento da suspensão acima (aproximadamente 30 minutos).

A purificação do DNA foi feita com adições sucessivas de solução de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (25:1:24) na suspensão de células lisadas na proporção de 1:1. A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa final foi adicionada etanol gelado na proporção de 1:2. A suspensão foi deixada por 2 horas à -20 °C para a precipitação do DNA, que foi retirado com auxílio de bastão de vidro. Após a secagem à temperatura ambiente, este foi suspenso em 500 µl de solução TE (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e EDTA 1mM). Esta suspensão foi tratada com 3 µl de RNase (10mg/ml) a 37 °C por 2 horas. Posteriormente, foi adicionado 50 µl de proteinase K

500 mg/ml e incubado a 37 °C por 1 hora. Foi efetuado novamente, a remoção de proteínas com adição de solução de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (25:1:24). Após a precipitação do DNA com 185 µl de acetato de amônio 7,5 M e adição de 2-propanol (1:2), este foi centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos, lavado com etanol 70 % e secado à temperatura ambiente. O precipitado foi suspenso em solução de TE e armazenado à -20 °C.

4. 3. 2. Digestão dos DNAs com enzimas de restrição

Os DNAs bacterianos foram digeridos com enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* em soluções tampões de acordo com recomendações do fabricante *Northumbria Biologicals Limited*.

4. 3. 3. Eletroforese do DNA

Alíquotas de 5 - 10 µg/ml de amostra de DNA genômico e de seus fragmentos foram transferidas para tubos tipo *Eppendorf* contendo solução corante (glicerol 25 %, dodecil sulfato de sódio 1 %, azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol 0,25 % e EDTA 150 mM, pH 8) e aplicadas em gel de agarose 0,8 % em solução TAE (Tris-acetato 4,0 mM/l, EDTA 1 mM/l, pH 8,0). A corrida de eletroforese foi feita em solução tampão TAE a 16 mA durante a noite (MANIATIS, 1982). Posteriormente, o gel foi imerso na solução tampão TAE contendo brometo de etídio 5 µg/ml por 20 minutos. Após a lavagem do gel com água, o DNA foi visualizado através de transiluminador e fotografado.

O DNA do bacteriófago λ digerido com *HindIII* foi utilizado como padrão de peso molecular com os seguintes valores: 23.130; 9.416; 6.682; 4.361; 2.323; 2.027 e 564 bp (*Northumbria Biologicals Limited*).

4. 3. 4. Transferência dos fragmentos de DNA da agarose para membrana de nitrocelulose (*Southern blotting*).

O gel de agarose foi imerso duas vezes em solução alcalina (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) por 15 minutos. Posteriormente, foi neutralizado duas vezes em solução de NH₄Ac 1,0 M e NaOH 0,02 M por 30 minutos.

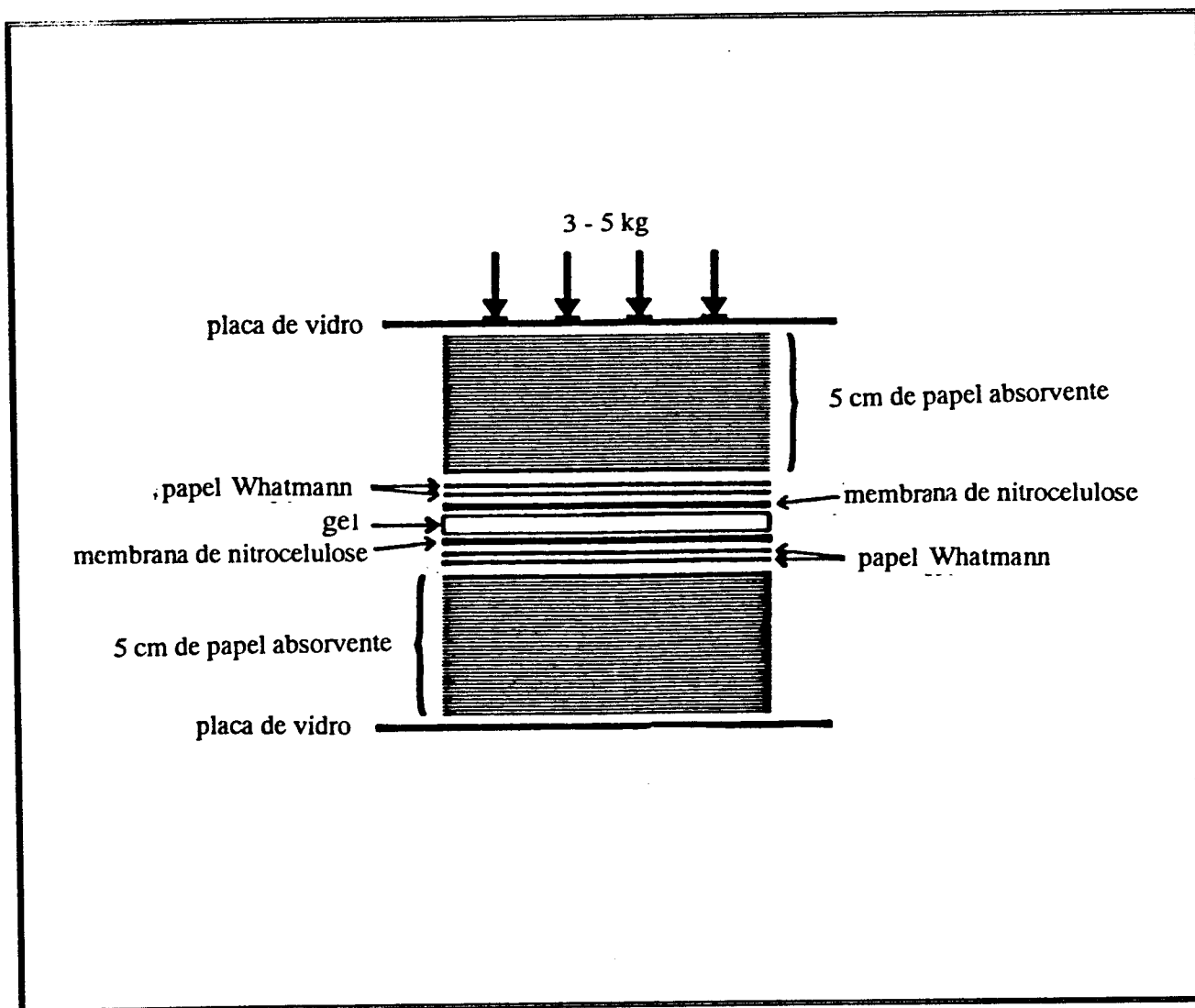


Figura 2. Transferência do DNA fragmentado contido no gel de agarose para membrana de nitrocelulose.

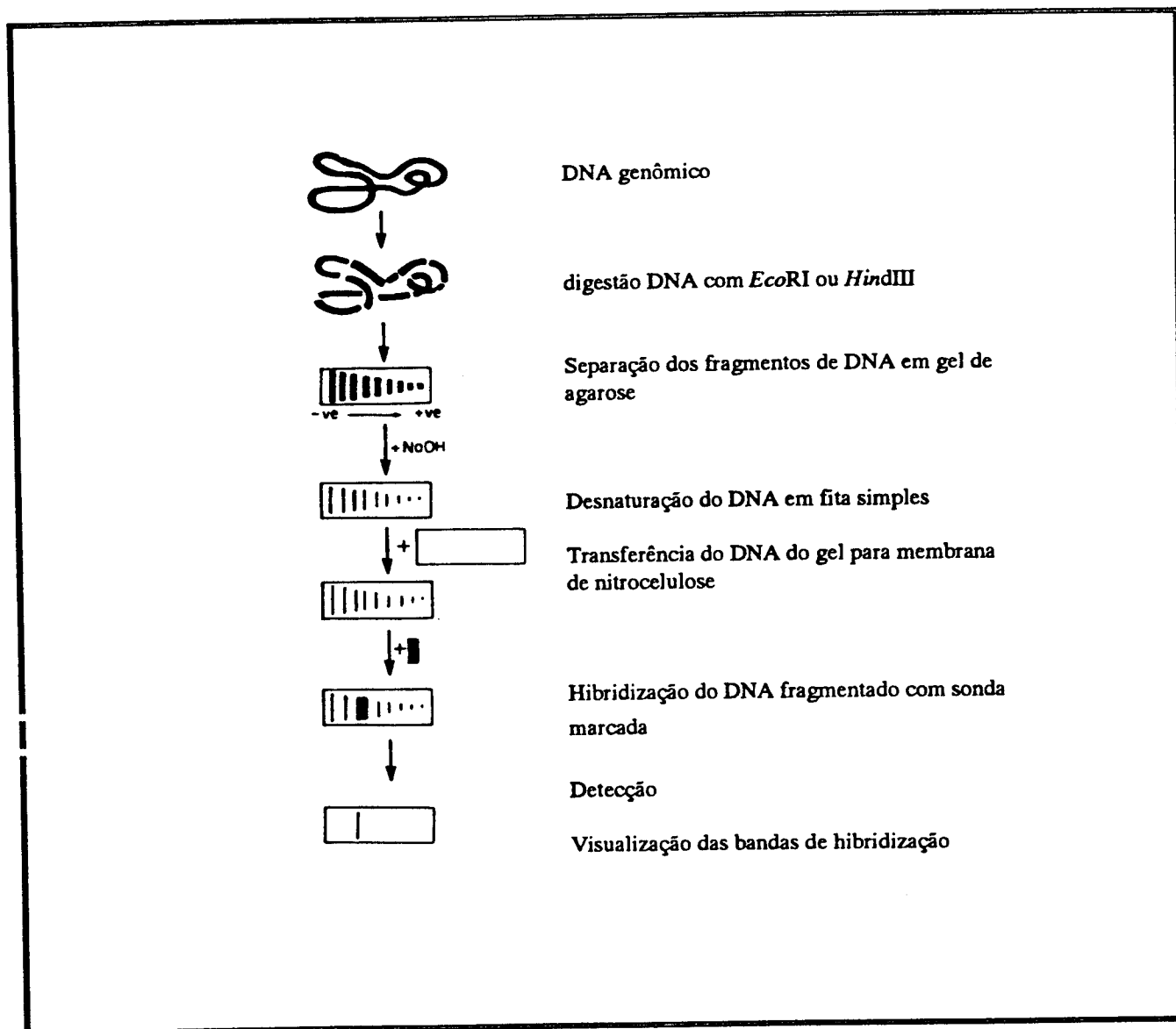


Figura 3. Etapas gerais da hibridização *Southern Blotting*.

Duas membranas de nitrocelulose e três folhas de papel de filtro *Whatman* nº 1 foram umedecidas na solução neutralizante (descrita acima). Cada membrana foi colocada em contato com o gel de agarose contendo o DNA a ser transferido, seguidas de folhas de papel de filtro *Whatman* nº 1 e papéis de toalha numa espessura de 5 cm de cada lado. Posteriormente, foi colocado peso de 3 a 5 kg na parte superior desta montagem (Figura 2).

A transferência dos fragmentos de DNA da agarose para a membrana de nitrocelulose foi feita no tempo mínimo de quatro horas.

4. 3. 5. Obtenção da sonda marcada do gene 16S rRNA de *B. subtilis* através de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi feita a reação de amplificação do gene 16s rRNA de *B. subtilis* S031 (Figura 4) marcando-a simultaneamente com desoxiuridina 5'-trifosfato ligada ao esteróide digoxigenina (Dig-UTP, *kit* não radioativo da Boehringer-Mannheim, cat. nº 1093 088) em tubo tipo *Eppendorf* (250 µl) contendo os seguintes componentes: DNA cromossômico de *B. subtilis* 5 ng, *primer* 1 (5'-GGATCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACG-3', nucleotídeos 6-31) 100 pmoles, *primer* 2 (5'-GGATCCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-3', nucleotídeos 1500-1484) 100 pmoles, dATP 250 µM, dCTP 250 µM, dGTP 250 µM, dTTP 200 µM, MgCl₂ 1,25 mM, tampão Taq (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9, triton X-100 0,1 %), Dig-UTP 70 µmoles, Taq DNA polimerase 2U (Promega - cat nº M186/1,2) e água MiliQ até 100 µl. A reação controle foi feita com os mesmos reagentes acima, exceto a adição de DNA.

Após homogeneização e rápida centrifugação, adicionou-se 100 µl de óleo mineral. A reação foi conduzida no *Tochne PHC-3* nas seguintes condições de temperatura, tempo e ciclos indicados na Tabela 8.

Tabela 8. Temperatura, tempo e ciclo da reação de PCR do gene 16S rRNA de *B.subtilis*

nº ciclos	Temperatura (°C)	tempo (min)
1	94	10
30	55	2
	72	3
	94	2
1	55	2
	72	10

Para facilitar o descarte do óleo mineral, o tubo de *Eppendorf* foi colocado previamente a -20 °C .

4. 3. 6. Obtenção da sonda de gene toxigênico referente a proteína 130 kD de *B.t.i.* por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os componentes da reação de amplificação do gene toxigênico referente ao cristal 130 kD do *B.t.i.* foram os seguintes: DNA genômico de *B.t.i.* 5 ng, dATP 250 µM, dCTP 250 µM, dGTP 250 mM e dTTP 250 mM, Mg₂Cl 1,25 mM, *primer* 3 (5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC3', região 740-760) 100 pmoles, *primer* 4 (5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC3', região 3328-3348) 100 pmoles, tampão Taq (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9, Triton X-100 0,1 %), Taq DNA polimerase 2 U (*Promega* - cat. nº M186/1,2) e água MiliQ até 100 µl. Foi feito o controle da reação adicionando-se os mesmos reagentes, exceto o DNA.

Após homogeneização e rápida centrifugação, adicionou-se 100 µl de óleo mineral. A reação foi conduzida no *Tochne PHC-3* nas condições de temperatura, tempo e ciclos indicados na Tabela 9. A Figura 4 ilustra as etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Tabela 9. Temperatura, tempo e ciclo da reação de PCR do gene toxigênico

nº ciclos	temperatura (°C)	tempo (s)
10	94	40
	50	30
	72	120
20	92	40
	50	30
	72	150
1	72	300

O produto da reação foi colocado a -20 °C no mínimo 1 hora com a finalidade de facilitar a retirada do óleo mineral.

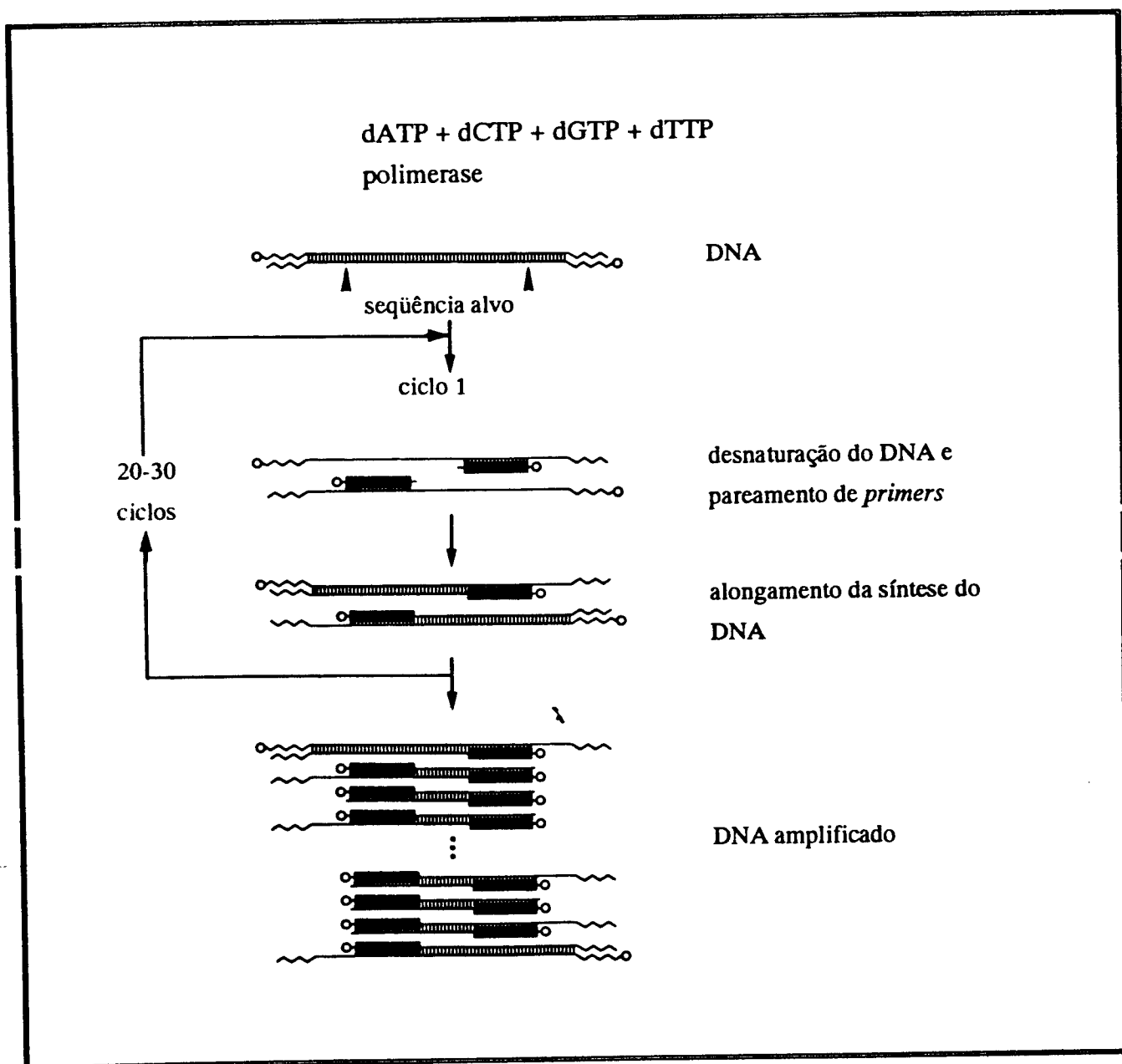


Figura 4. Representação simplificada da reação em cadeia da polimerase (PCR). (◻), *primer*; (:), DNA amplificado no mínimo 10^5 vezes ao original.

4. 3. 7. Marcação da sonda do gene toxigênico de *B.t.i.*

A sonda do gene toxigênico referente ao cristal 130 kDa foi marcada com Dig-UTP (*kit* não radiativo, *Boehringer-Mannheim*, Cat. nº 1093 657) de acordo com as instruções do fabricante.

Quantidades de 3 µg de sonda de DNA (obtida no item anterior) foram desnaturadas em água de ebulição por 10 min., transferidas imediatamente em banho de gelo por 3 minutos e em seguida, foram adicionadas as seguintes soluções: 10 µl de mistura de hexanucleotídeo (*Boehringer-Mannheim*, Cat. nº 1034 731), 10 µl de mistura de dNTP e Dig-UTP (*Boehringer-Mannheim*, Cat. nº 1093 657) e 5 µl de enzima *Klenow* (2 UI/µl).

A incubação foi feita à 37 °C por 20 horas. A reação foi interrompida com a adição de 2 µl de EDTA 0,2 M, pH 8,0 e o DNA foi precipitado com a adição de 2,5 µl LiCl 4M e 75 µl de etanol. Após incubação à -20 °C por 1 hora, o DNA foi recuperado por centrifugação, lavado com etanol e secado sob vácuo.

Posteriormente, o DNA foi dissolvido em 100 µl de solução de TE e estocado a -20 °C para uso posterior em hibridização.

4. 3. 8. Hibridização do DNA

A membrana de nitrocelulose foi previamente umedecida em solução de SSC 2x (NaCl 0,3 M e citrato de Na 0,03 M, pH 7,0) e colocada em um saco plástico de polietileno. Posteriormente, adicionou-se solução de hibridização (NaCl 0,75 M, citrato de Na 75 mM, pH 7,0 (SSC 5x), SDS 0,02 %, N-lauril sarcosine 0,1 %, reagente bloqueante 5 % (*Boehringer-Mannheim*, Cat. nº 1096 176) e formaldeído 40 %). O saco plástico foi selado e incubado a 42 °C por 1 hora.

5 µg de sonda de DNA marcado com Dig-UTP foi dissolvida em 100 µl de água, desnaturada por aquecimento (100 °C por 10 minutos) e transferida em um saco de plástico contendo a membrana em solução de hibridização recém preparada. Após a incubação à 42 °C durante a noite, a membrana foi lavada sucessivamente da seguinte maneira: duas vezes com solução SSC 2x e SDS 0,1 % (p/v) durante 5 minutos à temperatura ambiente e duas vezes com SSC 0,1 % e SDS 0,1 % (p/v) a 62 °C por 15 minutos.

4. 3. 9. Detecção do DNA hibridizado

A detecção foi efetuada através da solução conjugada do anticorpo e enzima (anti-digoxigenina fosfatase alcalina 150 U/ml, *Boehringer-Mannheim*, cat. nº 093 274) e solução de azul de nitro tetrazólio.

A membrana foi imersa em 20 ml da solução conjugada de anticorpo e enzima (4 µl de anti-digoxigenina fosfatase alcalina em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM). A incubação foi feita a temperatura ambiente por 30 minutos com agitação constante. A membrana foi lavada duas vezes com 100 ml da solução tampão I (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM) durante 10 minutos e mantida em 50 ml de solução tampão II (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM e MgCl₂.6H₂O 50 mM) por 2 minutos. Posteriormente, a membrana foi colocada em saco plástico contendo 25 ml de solução corante ² (solução de azul de nitro tetrazólio 0,3375 mg/ml e solução x-fosfato 0,175 mg/ml em tampão II).

A membrana foi deixada na solução corante e na ausência de luz no tempo máximo de três dias. A detecção das bandas hibridizadas foi interrompida com solução TE por 5 minutos e a membrana secada a 37 °C.

4. 3. 10. Análise computacional dos perfis de restrição do gene ribossomal RNA

Os perfis de hibridização foram analisados conforme a presença/ausência de banda registrada em todo segmento de banda visualizada. Baseando-se na presença/ausência de bandas foi atribuído valores positivo/negativo e calculado a similaridade de *Jaccard* (S_J) ³ e analisado pela média dos agrupamentos (*average linkage cluster analysis*) (AUSTIN & PRIEST, 1988).

² Foi preparada soluções estoques de: (1) 75 mg/ml de azul nitro tetrazólio (*Boehringer-Mannheim*, Cat. nº 1087479) e (2) 50 mg/ml de x-fosfato (5-bromo, 4-cloro, 3-indoil fosfato 50 mg/ml, *Boehringer-Mannheim*, Cat. nº 760986) em dimetilformamida 70 % e estocadas à -20 °C.

³ coeficiente de Jaccard (S_J)

$$S_J = \frac{a}{a + b + c}$$

sendo : a número de positivos que se correspondem; b e c números de caracteres que não se correspondem entre os pares de unidades taxonômica (*operational taxonomic units*).

4. 4. Perfis de restrição dos genes toxigênicos de B.t.i.

O gene toxigênico amplificado de B.t.i. de referência e isolados obtidos no item 4. 3. 5. foi digerido com enzima de restrição *Sau3AI* em solução tampão de acordo com recomendações do fabricante *Northumbria Biologicals Limited*.

O DNA digerido foi adicionado em 3 µl de solução corante e aplicado em gel Nusieve GTG Agarose 2 % (ver item 4. 3. 3). Após a corrida de eletroforese, este foi imerso em solução TAE contendo brometo de etídio, visualizado através de transiluminador e fotografado.

Os fragmentos do gene toxigênico digeridos com as enzimas de restrição existentes no mercado, inclusive *Sau3AI* foram analisados pelo programa de computação *Sequaid* (F. G. Priest, comunicação pessoal).

RESULTADOS & DISCUSSÃO

1. Isolamento de *Bacillus* entomopatogênicos

De acordo com a lista de validação de espécies do *International Journal of Systematic Bacteriology* são reconhecidas apenas cinco espécies de *Bacillus* entomopatogênicos: *Bacillus larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* (SNEATH, 1986; PRIEST, 1989b) que foram isolados principalmente de solos, água e insetos mortos ou doentes (PRIEST, 1989a; SMITH & COUCHE, 1991). Neste trabalho, procurou-se isolar entomopatogênicos a partir de solos de diferentes regiões e ecossistemas brasileiros (Tabela 3).

Em geral, os bacilos crescem facilmente em meio simples como ágar nutriente¹. Apenas *Bacillus larvae*, *B. popilliae* e *B. lentimorbus* exigem meio mais rico como ágar J¹. Desta forma, estes bacilos podem ter sido ocultados no isolamento realizado em meio ágar NY¹.

A pré-seleção dos bacilos esporulados foi feita com tratamento térmico a 80 °C por 10 min da suspensão de solos e microrganismos com a finalidade de selecionar apenas células esporuladas.

2. Teste de entomopatogenicidade

A partir de 956 colônias isoladas de diferentes solos, foram selecionadas 9 que apresentaram cristal e/ou toxicidade a larvas de *Aedes fluviatilis*. As outras bactérias isoladas por outros pesquisadores (CCT0434, CCT2264, CCT2265, CCT2339, CCT2340 e CCT2344 (Tabela 4) foram incluídas no teste de atividade larvicida e de caracterização e identificação, perfazendo um total de 15 isolados.

¹A composição do ágar nutriente para 1000 ml é: extrato de carne 3 g, peptona 5 g e ágar 15g, pH 6,8 enquanto que o do ágar J é: triptona 5 g, extrato de levedura 15 g, K₂HPO₄ 3 g, glicose 2 g e ágar 20 g, pH7,3-7,5 e o meio ágar NY contém ágar nutriente suplementado com extrato de levedura 0,3 %.

As linhagens de *B. thuringiensis* referência (subespécie *israelensis* IPS82, CCT2221, *kurstaki* HD-1 e HD-73 e *tenebrionis*), *B. sphaericus* referência (ATCC14577, SSII-1, 2362 e 31) e os 15 isolados (indicados na Tabela 4) foram testadas quanto à atividade larvicida em *Aedes fluviatilis*.

É fato sabido que poucas linhagens de *B. sphaericus* são patogênicas aos insetos. As linhagens patogênicas de *B. sphaericus* tem mostrado maior eficiência que os B.t.i. no combate de *Culex*, *Mansonia* e algumas espécies de anófeles. Entretanto, apresentam patogenicidade insignificante para simuliídeos e algumas espécies de *Aedes* como *Ae. aegypti* (LEE *et al.*, 1986; WHO, citado por SINGER, 1988; PRIEST, 1992). Outras espécies de *Aedes* como *melanimon*, *triseratus* e *nigromaculis* mostraram ser susceptíveis ao *Bacillus sphaericus* (WHO, citado por SINGER, 1988).

A linhagem de referência de *B. sphaericus* 2362 causou 100 % de mortalidade nas larvas de *Aedes fluviatilis* em nível de densidade celular (massa celular seca ao redor de 1,0 µg/ml.) Este resultado foi semelhante ao apresentado pelas linhagens de referência de B.t.i. (IPS82 e CCT2221), bem como, 12 isolados (CCT2257, CCT2258, CCT2259, CCT2260, CCT2261, CCT2264, CCT2339, CCT2340, CCT2341, CCT2342, CCT2343 e CCT2344). Para a confirmação da potencialidade tóxica destas linhagens a larvas de *Aedes fluviatilis* seria interessante determinar a concentração letal de 50 % de larvas (LC₅₀). Infelizmente não foi possível esta determinação devido a falta de disponibilidade destas larvas na época em que este experimento estava sendo realizado.

Apesar disto, em geral, os dados obtidos corresponderam aos indicados na literatura. A linhagem 2362 é descrita como altamente tóxica, SSII-1 como tendo baixa toxicidade principalmente ao *Culex* (BAUMANN *et al.*, 1987; PRIEST, 1992) e a ATCC14577 como não patogênica (KRYCH *et al.*, 1980; SINGER, 1988).

A linhagem SSII-1 causou 100 % de mortalidade em leitura de 24 horas quando foi utilizada suspensão celular mais concentrada (massa celular seca de aproximadamente 42 µg/ml) comparada com a linhagem 2362 (massa celular seca de 1,0 µg/ml). Já as linhagens de *B. sphaericus* ATCC14577 e 31, *B.thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (B.t.t.) e dois outros isolados (CCT2265 e CCT2338), apesar de apresentarem cristal, não causaram danos a larvas do mosquito em leituras de 24 horas, mesmo em alta densidade celular (massa celular ao redor de 1.200 µg/ml).

A linhagem de referência B.t.k. HD-1 e o isolado CCT0434, ambos de sorotipo H3a, 3b, ocasionaram 100 % de mortalidade nas larvas de *Aedes* em suspensão celular mais densa (massa celular seca de aproximadamente 100 µg/ml) que as linhagens de B.t.i.. Embora o B.t.k. HD-73 possua o mesmo sorotipo (H3a, 3b), esta linhagem não foi letal a larvas de *Aedes*. Esta característica tem sido citada por vários autores (DANKOCSIK *et al.*, 1990; DE BARJAC & FRACHON, 1990) dado ao fato desta linhagem não possuir a proteína CryIIA como o B.t.k. HD-1 (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

3. Taxonomia de *Bacillus* entomopatogênicos

Os testes efetuados para a caracterização e identificação dos *Bacillus*, assim como, a designação das linhagens e respectivos sorotipos estão identificados na Tabela 10.

3. 1. Caracterização e identificação de *Bacillus*

O volume 2, secção 13 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) apresenta o gênero *Bacillus* com 34 espécies definidas e 26 espécies *incertae sedis*.

O gênero *Bacillus* apresenta características heterogêneas que podem ser observadas nos diferentes perfis do metabolismo de carboidratos, na diversidade da composição de parede celular, grande intervalo de % de G+C (32-69) e na variabilidade de tolerância de pHs e de temperaturas extremas (CLAUS & FRITZE, 1989). Esta última característica somada à baixa incidência de patogenicidade ao homem (exceto o *B. anthracis* e *B. cereus*) oferece grandes atrativos para aplicação industrial do gênero *Bacillus* (HARWOOD, 1989).

Apesar da diversidade, o gênero *Bacillus* pode ser facilmente diferenciado de outros gêneros de bactérias aeróbias formadoras de endosporos (PRIEST, 1989a). Linhagens de *Bacillus* apresentam a forma de bastonetes retos ou ligeiramente retos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos com flagelos peritríquo ou degenerado, formadores de endosporos, reação *Gram* positiva em culturas jovens e catalase positiva (SNEATH, 1986; PRIEST, 1989a).

Todos isolados que se enquadraram nas características citadas acima (Tabela 10), podem ser identificados como pertencentes do gênero *Bacillus*.

Tabela 10. Sorotipo das linhagens de *Bacillus* e testes realizados para a caracterização e identificação.

Nº	linhagens	designação	sorotipo (H)	testes
1	<i>B. anthracis</i>	BA1		3 e 4
2	<i>B. anthracis</i>	BA6		3 e 4
3	<i>B. anthracis</i>	BA68		3 e 4
4	<i>B. anthracis</i>	BA69		3 e 4
5	<i>B. cereus</i>	DSM31		1, 3 e 4
6	<i>B. cereus</i>	S68	5(□)	3
7	<i>B. cereus</i>	S71	8(□)	3
8	<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycoides</i>	S83		3
9	<i>B. sphaericus</i>	2362	5a, 5b(Δ)	2
10	<i>B. sphaericus</i>	31	9a, 9c(Δ)	2
11	<i>B. sphaericus</i>	SSII-1	2a, 2b(Δ)	2
12	<i>B. sphaericus</i>	ATCC14577		2
13	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	S476	7 (∇)	3
14	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	S477	7(∇)	3 e 4
15	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	T7002	7(∇)	3
16	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>	S332	3a(∇)	3 e 4
17	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>	T3001	3a(∇)	3
18	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i>	S331		3 e 4
19	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>dendrolimus</i>	S469	4b(∇)	3 e 4
20	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>dendrolimus</i>	T4A001	4b(∇)	3
21	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>	S474	6(∇)	3 e 4
22	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>	T5001	5(∇)	3
23	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>	T5002	5(∇)	3
24	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	IPS82	14(∇)	1, 2, 3, 4 e 5
25	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	CCT2221	14(∇)	1 e 2
26	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	HD-1	3a, 3b(∇)	1, 2, 3 e 4
27	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	HD-73	3a, 3b(∇)	1, 2, 3 e 4
28	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	S466	3a, 3b(∇)	3
29	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	S467	3a, 3b(∇)	3
30	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	T3A002	3a, 3b(∇)	3

(Continuação da Tabela 10)

Nº	linhagens	designação	sorotipo (H)	testes
31	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	T8001	8a, 8b(∇)	3
32	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	T8002	8a, 8b(∇)	3
33	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i>	S468	4a, 4b(∇)	
34	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i>	T4001	4a, 4b(∇)	3
35	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>subtoxicus</i>	T6002	6a, 6b(∇)	3
36	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>		8(∇)	1, 2, 3 e 4
37	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	S336		3
38	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	S337	1(∇)	3
39	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>	S461	9(∇)	3 e 4
40	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>	T9002	9(∇)	3
41	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>	T9001	9(∇)	3
42	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>	T9002	9(∇)	3
43	isolado 275	CCT2341	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
44	isolado 276	CCT2343	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
45	isolado 287	CCT2257	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
46	isolado 288	CCT2342	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
47	isolado 291	CCT2258	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
48	isolado 574	CCT2338	NS(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
49	isolado 976	CCT2259	14(◇)	1, 2, 3, 4 e 6
50	isolado 977	CCT2260	NS(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
51	isolado 978	CCT2261	5(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
52	isolado A.3.3	CCT2344	14(◇)	1, 2, 3, 4, e 6
53	isolado A.3.5 branco	CCT2339	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
54	isolado A.3.5 rosa	CCT2340	14(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
55	isolado MTP-2	CCT2264	NS(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
56	isolado B.t.m.	CCT2265	8a, 8b(◇)	1, 2, 3, 4, 5 e 6
57	isolado ZOOCAMP	CCT0434	3a, 3b(◇)	1, 2, 3, 4, e 6

(□), PRIEST *et al.* (1988); (Δ), DE BARJAC *et al.* (1985); (∇), DE BARJAC & FRACHON (1990); (◇), Institut Pasteur, NS, não sorotipado; 1, testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos; 2, perfis eletroforéticos de proteínas totais; 3, perfis de hibridização com o gene 16S rRNA; 4, perfis de hibridização com o gene do cristal de B.t.i.; 5, perfis de restrição do gene toxigênico digeridos com *Sau3AI*; 6, teste de sorologia.

3. 2. Caracterização e identificação de *Bacillus* a nível de espécie através de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos

Os resultados dos testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos obtidos para as linhagens de referência e isolados selecionados estão indicados na Tabela 11.

3. 2. 1. Aspecto morfológico

As colônias de *Bacillus* podem apresentar aspecto e tamanho bastante variado. É fato sabido que as colônias podem variar de acordo com fatores ambientais, ou seja, composição ou conteúdo de mistura do meio, temperatura ou atmosfera de incubação. A exceção de colônias muito pequenas, o tamanho da colônia pode variar com o número de colônias presentes na placa, composição do meio e quantidade de ágar. Os isolados selecionados não apresentaram grandes diferenças na morfologia das colônias. Com exceção do isolado CCT2261, todos apresentaram colônias de tamanho de 3 a 5 mm de diâmetro, forma circular e elevada, borda ondulada, superfície granulosa, opaca, branca e consistência úmida enquanto que o isolado CCT2261 apresentou colônia de tamanho 1,0-1,5 mm de diâmetro, forma circular e convexa, borda e superfície lisa, opaca, pigmentação branca a amarelada e consistência úmida (Tabela 11).

As células se apresentaram isoladas, em pares ou em cadeias relativamente longas ao microscópio óptico. Todas as células dos isolados apresentaram forma de bastonete, com esporos e inclusões cristalinas (Tabela 11). Entre os métodos tradicionais, o tamanho do esporângio e a morfologia e localização dos esporos são bastante significativos na classificação dos *Bacillus* (PRIEST, 1989a). As espécies de *Bacillus* podem ser classificadas de acordo com os seguintes tipos de esporos e características de esporângio: (1) elipsóide central e mesmo tamanho do esporângio (*B. thuringiensis*), (2) elipsóide e esporângio entumescido (*B. larvae*, *B. lentimorbus* e *B. popilliae* (central para terminal) e (3) esférico terminal e esporângio entumescido (*B. sphaericus*) (GORDON *et al.*, 1973; SNEATH, 1986; PRIEST, 1989a). Desta forma, os isolados foram tentativamente caracterizados como *thuringiensis*, exceto CCT2261 que apresentou maior semelhança com *B. sphaericus*.

3. 2. 2. Características bioquímicas e fisiológicas

Os estudos de classificação de *Bacillus* tem sido baseado no extenso trabalho de GORDON *et al.* (1973). Basicamente todos os testes de identificação destas bactérias foram realizados de acordo com a metodologia e meios de cultura recomendado pelos autores citados acima e PRIEST (1989a). Os testes bioquímicos e fisiológicos apontam grande similaridade entre o *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*. Estas espécies apresentam reação positiva a vários testes como: hidrólise de caseína, amido, crescimento em NaCl 7 %, lisozima e pH 5,6, degradação de tirosina, redução de nitrato a nitrito, reação de oxidase e utilização de citrato. Porém, fermentam poucos açúcares como celobiose e glicose e não possuem urease (Tabela 11).

Exceto o isolado CCT2261, os demais isolados podem ser identificados como *Bacillus thuringiensis* pela presença de cristal nas células observadas no microscópio com contraste de fase. O isolado CCT2261 apresentou reações negativas para os seguintes testes: *Voges-Proskauer*, produção de ácido a partir de carboidratos, hidrólise de amido e caseína, crescimento a NaCl 10 %, urease, redução de nitrato a nitrito e degradação da tirosina. Considerando-se estas características e a morfologia do esporo esférico e esporângio entumescido, o CCT2261 pode ser identificado *Bacillus sphaericus*.

Tabela 11. Características fenotípicas das linhagens de referência e isolados

testes	<i>B. thuringiensis</i> (referência ⁽¹⁾ e isolados ⁽²⁾)	<i>B. sphaericus</i> ATCC14577 e isolado CCT2261
tamanho da colônia (mm)	3-5	1,0-1,5
aspecto da colônia	circular, elevada, borda ondulada, superfície granulosa, úmida, opaca e branca.	circular, convexa, borda lisa, superfície lisa, úmida, opaca e branco a amarelado
reação <i>Gram</i>	+	+
motilidade	+	+
forma do esporo	elipsóide	esférico
esporângio entumescido	-	+
presença de cristal	+	+
catalase	+	+
produção de ácido a partir de:		
L-arabinose	-	-
celobiose	+	-
galactose	-	-
glicose	+	-
manitol	-	-
D-xilose	-	-
hidrólise de:		
amido	+	-
caseína	+	-
Crescimento em:		
NaCl 7 %	+	+
NaCl 10 %	ND	-
pH 5,6	+	-
lisozima	+	ND
fermentativo	+	-
oxidativo	+	+
<i>Voges Proskauer</i>	+	-
redução de nitrato a nitrito	+	-
degradação da tirosina	+	-
atividade hemolítica ⁽³⁾	+	-
utilização de citrato	+	+
urease	-	-

(1), *Bacillus thuringiensis* de referências: B.t.i. IPS82, CCT2221, B.t.k. HD-1, B.t.k. HD-73, B.t.t.; (2) isolados CCT434, CCT2257, CCT2258, CCT2259, CCT2260, CCT2264, CCT2265, CCT2338, CCT 2339, CCT2340, CCT2341, CCT2342, CCT2343 e CCT2344; (3), os resultados estão ilustrados nas Figuras 5 e 10 (a seguir no texto); ND, não determinado.

3. 3. Caracterização e identificação do grupo de *B. sphaericus* e da subespécie de *B. thuringiensis*.

3. 3. 1. Teste de sorologia

Dos 13 isolados toxigênicos ao *Aedes*, um (1) foi sorotipado como H3a, 3b, um (1) como H5, nove (9) como sorotipo H14 e dois (2) não puderam ser sorotipados com os 34 antisoros existentes no *Institut Pasteur*. De dois isolados não toxigênicos ao *Aedes*, um (1) foi sorotipado como H8a,8b e o outro não pode ser sorotipado (Tabela 12). DE BARJAC & FRACHON (1990) classificam as linhagens com sorotipo H3a, 3b como subespécie *kurstaki*, sorotipo H14 como *israelensis* e o sorotipo H8a, 8b como *morrisoni* ou *tenebrionis* ou *san diego* (DE BARJAC & FRACHON, 1990). O sorotipo H5 corresponde a espécie de *Bacillus sphaericus* altamente tóxica (DE BARJAC *et al.*, 1985). A Tabela 12 sumariza os dados citados acima.

Com base na sorologia, 9 isolados foram identificados como sendo subespécie *israelensis*, 1 como *kurstaki*, 1 como *morrisoni* ou *san diego* ou *tenebrionis* e uma espécie como *sphaericus*.

3. 3. 2. *Bacillus sphaericus*

KRYCH *et al.* (1980) estudaram a relação genética de 62 linhagens de *B. sphaericus* através da reassociação do DNA. Através destes resultados, distribuíram o *B. sphaericus* em 5 grupos de homologia: I, IIA, IIB, III, IV e V. A classificação de *B. sphaericus* analisada pela taxonomia numérica confirma estes grupos distintos (ALEXANDER & PRIEST, 1990). Apenas com base nas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, seria impossível distinguir o grupo IIA e IIB (SINGER, 1980; SNEATH, 1986). O grande interesse em diferenciar principalmente o grupo IIA tem sido devido a sua característica de patogenicidade aos mosquitos (principalmente *Culex*) e simulídeos. Este grupo corresponde ao *phenon* 3a obtida pela taxonomia numérica de ALEXANDER & PRIEST (1990) e compreende linhagens com alta e baixa toxicidade (PRIEST, 1992).

DE MURO *et al.* (1992) sugerem que este grupo patogênico seja uma subespécie separada de *B. sphaericus* através de análise de perfis de hibridização com gene 16S rRNA de *E. coli*.

Tabela 12. Isolados identificados pela sorologia

isolados	toxicidade ao <i>Aedes fluviatilis</i>	sorologia H	subespécie
CCT0434	(+)	3a, 3b	<i>kurstaki</i>
CCT2257	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2258	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2259	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2260	+	NS	NI
CCT2261	+	5	<i>sphaericus</i> (●)
CCT2264	+	NS	NI
CCT2265	-	8a, 8b	<i>morrisoni/san diego/tenebrionis</i>
CCT2338	-	NS	NI
CCT2339	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2340	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2341	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2342	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2343	+	14	<i>israelensis</i>
CCT2344	+	14	<i>israelensis</i>

+, toxicidade alta; (+), toxicidade baixa; -, não tóxica; H, antígeno flagelar; NS, não sorotipado; NI, não identificado; (●), a nível de espécie.



Figura 5. Teste da atividade hemolítica de *B. sphaericus*: (1) ATCC14577, (2) CCT2261, (3) SSII-1, (4) 2362 e (5) 31.

3. 3. 2. 1. Atividade hemolítica de *Bacillus sphaericus*

As linhagens de B.t. apresentam atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro (THOMAS & ELLAR, 1983; CASTRO, 1990). No entanto, este tipo de informação não tem sido citado para o *B. sphaericus*. Desta forma, foi feito o ensaio de atividade hemolítica de linhagens referências (ATCC14577, SSII-1, 2362 e 31) e o isolado CCT2261.

Este teste não diferenciou o grupo IIA, patogênico a larvas de mosquitos ou *phenon* 3a (SSII-1, 2362 e 31) do grupo I não patogênico (ATCC14577). Nenhuma das linhagens de *B. sphaericus*, incluindo o isolado identificado como *B. sphaericus* (CCT2261) apresentou atividade hemolítica em sangue de carneiro (Figura 5).

Entretanto, as linhagens de B.t. apresentaram atividade hemolítica (Figura 10). Isto indica que este teste pode ser útil e/ou alternativo para a diferenciação de linhagens de *Bacillus sphaericus* de *Bacillus thuringiensis*.

3. 3. 2. 2. Degradação da adenina

Um teste alternativo e rápido para a indicação de patogenicidade de linhagens de *B. sphaericus* a larvas de mosquitos pode ser feita através da degradação da adenina (PRIEST & YOSTEN, 1991). A Figura 6 ilustra a degradação da adenina pelas diferentes linhagens de *B. sphaericus* indicadas como (1) altamente tóxica (linhagem 2362 (BAUMANN *et al.*, 1987; SINGER, 1988; DE MURO *et al.*, 1992) e isolado CCT261, tóxica a *Aedes*, Tabela 10), (2) toxicidade baixa (linhagem SSII-1 (BROADWELL *et al.*, 1990; DE MURO *et al.*, 1992) e (3) toxicidade desconhecida (linhagem 31). Já a linhagem não toxigênica ATCC14577 (KRYCH *et al.*, 1980; SINGER, 1988), não degradou a adenina.

Embora este teste possa diferenciar linhagens toxigênicas e não toxigênicas, pela degradação ou não da adenina, as diferentes linhagens toxigênicas não mostraram correlação com os níveis de toxicidade. Por exemplo, a linhagem 2362 altamente tóxica apresentou halo menor que a linhagem SSII-1 de baixa toxicidade e a linhagem 31 de toxicidade desconhecida.



Figura 6. Teste da degradação da adenina das linhagens de *B. sphaericus*: (1) 2362, (2) SSII-1, (3) ATCC14577, (4) 31 e (5) CCT2261.

3. 3. 2. 3. Fagotipagem de *B. sphaericus*

A distinção entre linhagens de *Bacillus sphaericus* pode ser também melhor avaliada por fagotipagem. A partir de 54 isolados de *Bacillus sphaericus*, DE BARJAC *et al.* (1985) correlacionaram diferentes sorotipos com diferentes níveis de toxicidade. Os sorotipos H5a, 5b e H25 mostraram alta toxicidade ao *Culex* e toxicidade ao *Anopheles*. Enquanto que H2, H1a mostraram-se tóxicos apenas ao *Culex* e uma linhagem pertencente ao sorotipo H26a, 26b apresentou toxicidade ao *Anopheles*.

A tipagem de *Bacillus sphaericus* realizada por YOUSTEN (1984) com 10 bacteriófagos revelou 7 grupos diferentes. As linhagens pertencentes ao fagotipo do grupo 2 (linhagem 1593, sorotipo H6), 3 (linhagem 2362, sorotipo H5a, 5b) e 4 (linhagem 2297, sorotipo H25) indicaram atividades mais altas de toxicidade.

Os resultados obtidos por fagotipagem (Tabela 13) indicam que o isolado CCT2261 apresentou o mesmo comportamento que a linhagem referência de *B. sphaericus* 2362, conhecida como altamente tóxica a larvas de mosquitos (grupo 3), o que confirma esse isolado como pertencente ao grupo IIA ou *phenon* 3a de *B. sphaericus*.

Tabela 13. Origem, fagotipo, sorotipo e toxicidade das linhagens de *B. sphaericus*

linhagens	origem	fagotipo	bacteriófago 1A 63 4 14	sorotipo	nível de toxicidade
ATCC14577 ⁽¹⁾					nenhuma
SSII-1	Índia ⁽²⁾	2	+ + - -	2a,2b ⁽²⁾	baixa
2362	Nigéria ⁽²⁾	3	- - + +	5a, 5b ⁽²⁾	alta
31	Turquia ⁽²⁾	8	+ + + +	9a,9c ⁽²⁾	alta
CCT2261	Brasil	3	- - + +	5 ⁽³⁾	alta

(1), linhagem tipo, grupo de homologia 1 (KRYCH *et al.*, 1980); (2), YOUSTEN (1984); PRIEST & YOUSTEN (1991); (3), *Institut Pasteur*.

3. 3. 2. 4. Perfis de eletroforese de proteínas celulares solúveis totais de *B. sphaericus*

Para constatar o nível de similaridade do isolado CCT2261 com as demais linhagens de *B. sphaericus* foi efetuado a análise de proteínas celulares totais por eletroforese em SDS-PAGE. Os perfis de bandas de proteínas de cada linhagem foram comparadas entre si por meio de programa de computação PAGETAX 2.00 (JACKMAN, 1985) e o resultado na forma de dendrograma está ilustrado na Figura 7.

As linhagens patogênicas 2362, 31, SSII-1 e CCT2261 apresentam muitas bandas de proteínas em comum, principalmente as referentes aos pesos moleculares 107, 81 e 20 kD. Estas bandas foram ausentes ou muito fracas na linhagem não patogênica ATCC14577. Em contraste, apenas a linhagem tipo grupo I (ATCC14577) apresentou uma banda forte de 22 kD. Assim, *B. sphaericus* do grupo I e IIA podem ser diferenciados pelas bandas características. O isolado CCT2261 apresentou alta homologia com ambas linhagens de referência SSII-1 (0,88) e 2362 (0,72). Estas duas linhagens estão alocadas ao mesmo grupo taxonômico de *B. sphaericus* conforme descrito por KRYCH *et al.* (1980) e ALEXANDER & PRIEST (1990).

Embora a linhagem 31 apresente bandas em comum com outras linhagens patogênicas, esta possui o menor coeficiente de correlação (0,30) quando comparada as demais linhagens. A linhagem 31 se destaca das demais pela presença de bandas de 28, 22 e 21 kD e ausência da banda de 24 kD.

A porcentagem de similaridade entre as linhagens toxigênicas (SSII-1 e 2362) e não toxigênica (ATCC14577) foi de 50 % enquanto que entre as linhagens SSII-1 e 2362 foi de 72 %. Análises eletroforéticas feitas por YOUSTEN, citado por SINGER (1988) utilizando estas mesmas linhagens revelaram valores de similaridade de 35 e 88 % respectivamente. Já o trabalho de KRYCH *et al.* (1980) indicaram que a linhagem ATCC14577 (grupo I) possui 20 % de homologia da sequência de DNA com a linhagem toxigênica SSII-1 (grupo IIA).

Embora o *B. sphaericus* tenha sido isolados em várias partes do mundo, a ocorrência deste no Brasil tem sido pouco citada. SCHENKEL *et al.* (1992) também isolaram 4 linhagens de *B. sphaericus* provenientes de solos brasileiros com características de patogenicidade, sorologia (H5) e *immunoblotting* semelhantes a linhagem 2362. No entanto, análises de ácidos graxos destas linhagens por cromatografia gasosa revelaram pequenas diferenças com a linhagem 2362.

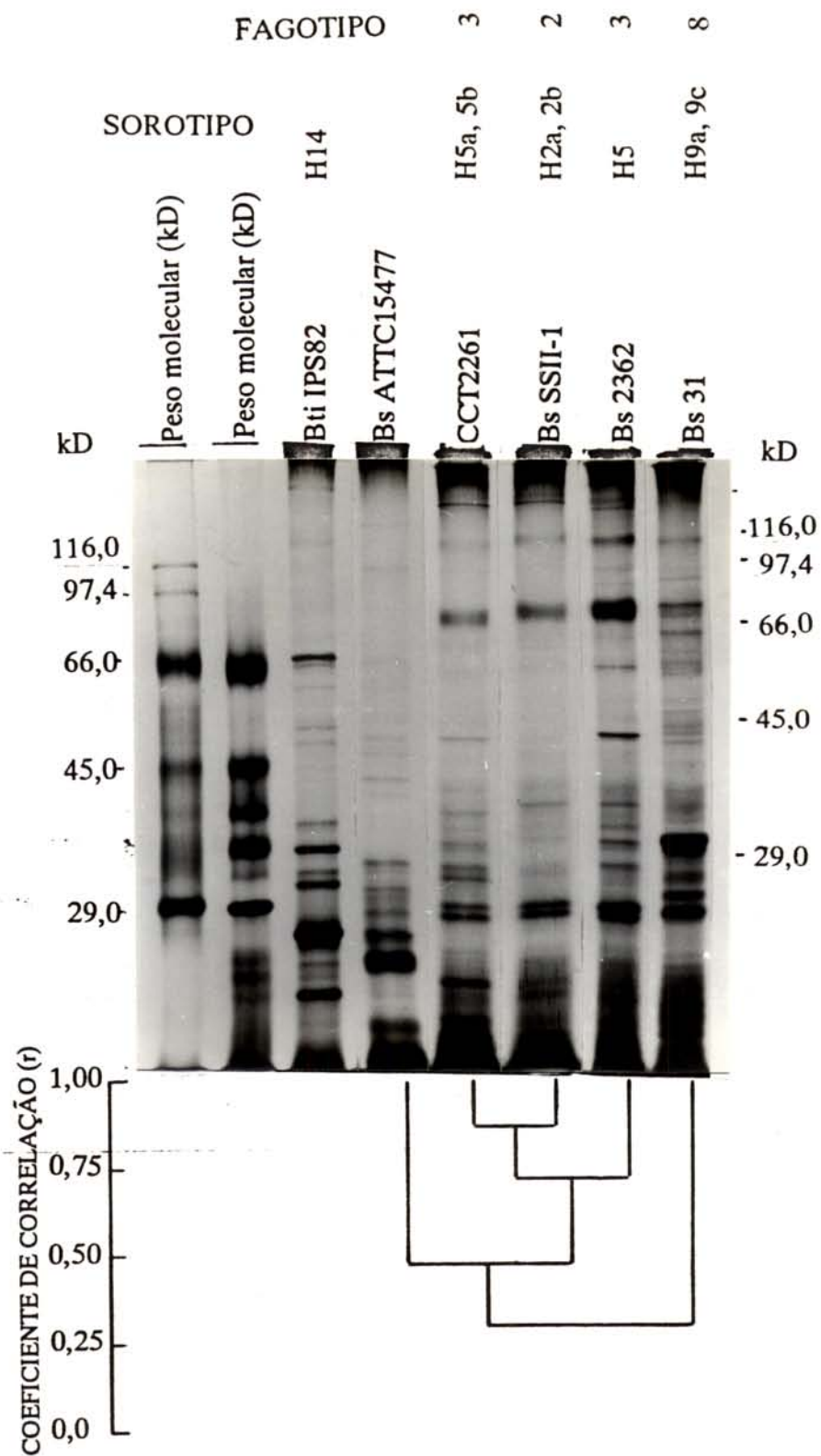


Figura 7. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares solúveis totais de *Bacillus sphaericus* e dendrograma correspondente.

As principais bandas de proteínas do cristal de *B. sphaericus* 2362 possuem peso molecular de 43, 63 e 110 kD (BAUMANN *et al.*, 1985; 1988). Nas etapas iniciais de crescimento de *B. sphaericus* as bandas de proteínas de 80-95 kD e de 125 kD aparecem com grande evidência. Posteriormente, com a esporulação estas bandas desaparecem enquanto que as bandas de 43, 63 e 110 kD tornam-se mais intensas (BROADWELL & BAUMANN, 1986). Neste experimento, as bandas de 43 e 63 kD não foram muito nítidas enquanto que as de 81 e 110 kD puderam ser detectadas com maior clareza.

3. 3. 2. 5. Polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLPs)

3. 3. 2. 5. 1. Obtenção das sondas moleculares

Através da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram obtidas sondas moleculares do gene 16S rRNA de *B. subtilis* S031 e do gene toxigênico de B.t.i. (Figura 8). Paralelamente foi efetuada uma reação de controle com os mesmos constituintes do PCR, porém sem a adição de DNA. O resultado revelou que a reação de PCR foi isenta de contaminações de outros DNAs.

O gene 16S rRNA amplificado (PM = 1,8 kb) com ou sem marcação simultânea com Dig-UTP (PM = 1, 7 kb) e padrão de peso molecular estão indicados na Figura 8a. Dada a complexidade da estrutura química e o alto peso molecular de Dig-UTP em relação a timina, o R_f da primeira apresentou ligeiramente menor do que a segunda ($\Delta R_f = 0,05$).

A sonda do gene toxigênico de B.t.i. IPS82 (PM = 2,6 kb) obtida por PCR está indicada na Figura 8b. Esta sonda corresponde a maior parte do gene da proteína de 130 kD (*cryIVA* e *cryIVB*) (Apêndice).

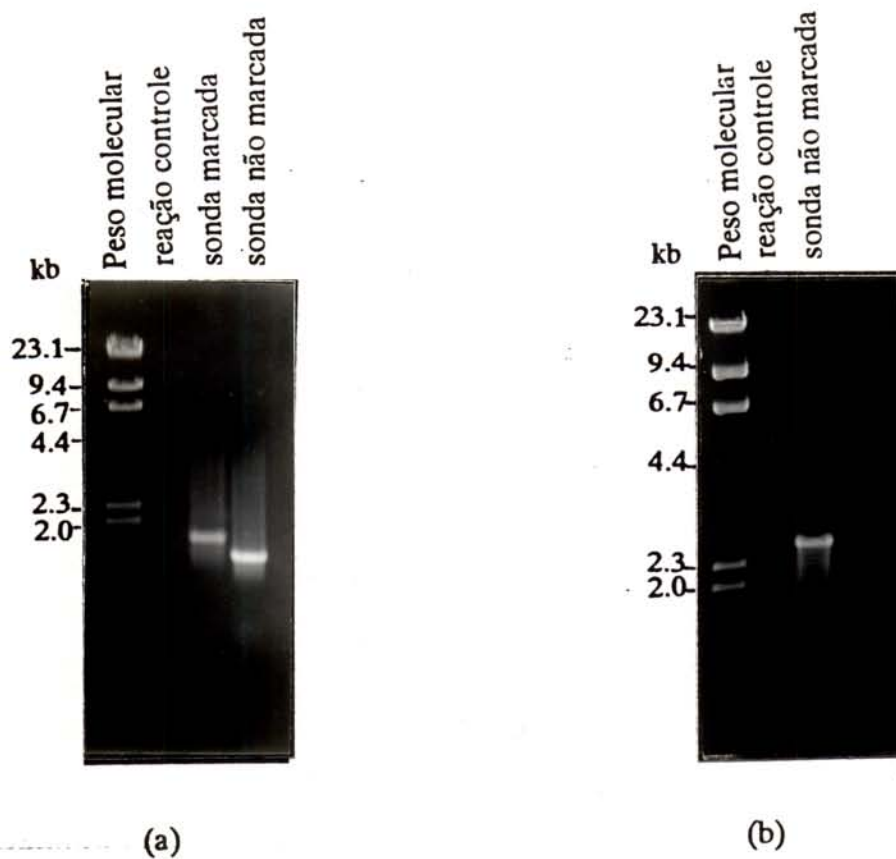


Figura 8. Sondas moleculares de (a) 16S rRNA e (b) gene toxigênico, obtidos através de PCR com DNA genômico de *B. subtilis* S031 e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82 respectivamente.

3. 3. 2. 5. 2. Perfis de hibridização com o gene 16S rRNA

Os fragmentos do DNA genômico do isolado CCT2261 obtidos com *Hind*III e *Eco*RI e separados por eletroforese em gel de agarose estão ilustrados na Figura 9a. Os perfis de hibridização com o gene 16S rRNA de *B. subtilis* S031 marcado com Dig-UTP e os fragmentos da Figura 9a estão indicados na Figura 9b.

Foram obtidos 8 (7,3 a 3,3 kb) e 9 (10,6 a 1,5 kb) bandas de hibridização com os fragmentos digeridos com *Hind*III e *Eco*RI, respectivamente. Resultados idênticos foram relatados por DE MURO *et al.* (1992) na hibridização com o gene 16S rRNA de *E. coli* e fragmentos de DNA genômico de linhagens de *B. sphaericus* do grupo IIA digeridos com *Hind*III e *Eco*RI.

A perfeita identidade dos resultados obtidos neste experimento e os de DE MURO *et al* (1992) reforça que o isolado CCT2261 pertence ao grupo IIA e evidencia as regiões conservadas do gene 16S rRNA das linhagens de *E. coli* e *B. subtilis*.

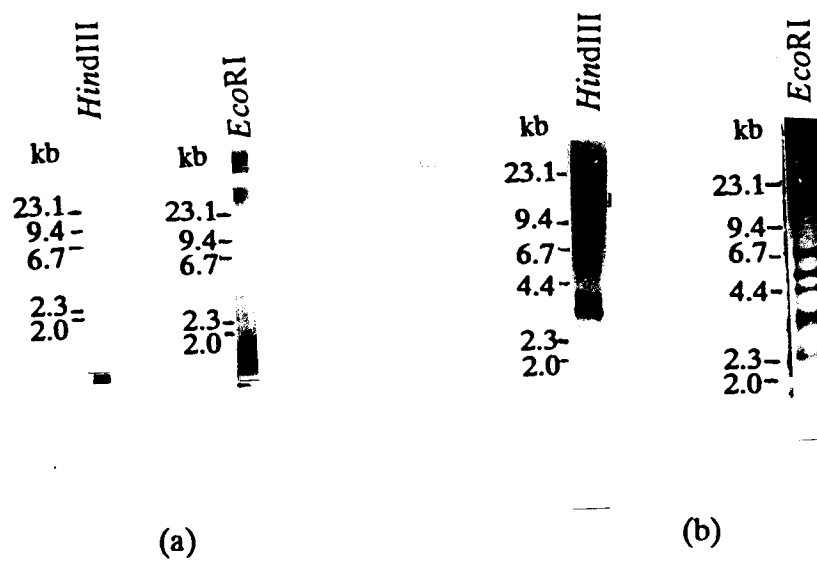


Figura 9. (a) Fragmentos de DNA genômico do isolado CCT2261 digeridos com *HindIII* e *EcoRI* e (b) hibridização de (a) com o gene 16S rRNA de *B. subtilis*.

3. 4. *Bacillus thuringiensis*.

3. 4. 1. Teste de atividade hemolítica de *Bacillus thuringiensis*

De acordo com DE MURO (1988) tanto *B. cereus* como *B. thuringiensis* apresentam atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro enquanto que o mesmo não ocorre com *B. anthracis*.

A Figura 10 ilustra a atividade hemolítica de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (IPS82, CCT2221), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1, HD-73), *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* e 15 isolados citados na Tabela 12.

As linhagens com sorotipo H3a, 3b (B.t.k. HD-1, HD-73 e CCT0434) e o isolado (CCT2338) não sorotipável com os antisoros existentes apresentaram hemólise do tipo α (halo difuso) enquanto que as demais linhagens (sorotipo H14, H8a, 8b, inclusive as que não puderam ser sorotipadas CCT2260 e CCT2264) produziram hemólise do tipo β (halo claro). ORDUZ *et al.* (1992) obtiveram mesmo resultado (halo β) com linhagens B.t.i. 1884 e B.t.m.. Apenas uma nova subespécie denominada de *neoleonensis* não produziu hemólise em ágar sangue.

Esses resultados confirmam a caracterização efetuada para os diferentes isolados e sugere que os isolados não sorotipados podem pertencer a subespécie *israelensis* ou *morrisoni* ou *tenebrionis*.

Segundo estudos de THOMAS & ELLAR (1983), o cristal solúvel δ -endotoxina de B.t.i. IPS78 causa hemólise em vários tipos de eritrócitos (cavalo, humano, carneiro, ratos e camundongos). O mesmo não ocorreu com cristal de B.t.k. HD-1. Desta forma, o tipo de cristal das respectivas bactérias pode influir na atividade hemolítica e é sugerido como um bom teste indicativo no processo de identificação de B.t. tóxicas a lepidópteros (halo α) e tóxicas a dípteros e coleópteros (halo β) devido a sua simplicidade e rapidez da análise.



Figura 10. Teste da atividade hemolítica de *Bacillus thuringiensis*. (1), B.t.i. IPS82; (2), B.t.k. HD-73; (3), B.t.k. HD-1; (4), B.t.i. CCT2221; (5), CCT2257; (6), CCT2343; (7), CCT2341; (8), B.t.t.; (9), CCT2260; (10), CCT2259; (11), CCT2338; (12), CCT2258; (13), CCT2342; (14), CCT2264; (15), CCT2340; (16), CCT2339; (17), CCT2344; (18), CCT2265 e (19), CCT0434.

3. 4. 2. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares solúveis totais de *Bacillus thuringiensis*

A Figura 11 ilustra os perfis eletroforéticos de proteínas celulares totais das linhagens de referência e dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e o correspondente dendrograma.

Não houve separação de certas bandas de proteínas, resultando em bandas múltiplas que podem ter influenciado na análise computacional do *cluster*. Porém, os resultados foram repetitivos e o perfil de uma linhagem apresentou-se sempre constante. Como esta técnica baseia-se na comparação de perfis eletroforéticos foi imprescindível a padronização do meio de cultura e das condições ambientais, como por exemplo, temperatura e tempo de cultivo das linhagens. As proteínas celulares totais de B.t.i. IPS82 e as proteínas padrões de peso molecular conhecido foram aplicadas em cada gel para posterior ajuste das diferenças de corrida da eletroforese entre os géis.

Os isolados com sorotipo 14 e mais 2 isolados (CCT2260 e CCT2264) que não puderam ser sorotipados apresentaram perfis eletroforéticos de proteínas bem semelhantes caracterizados principalmente pelas bandas de 20, 25, 36 (ausente apenas no isolado CCT2340) e 72 kD (ausente apenas no isolado CCT2264). Estes isolados juntamente com os B.t.i. de referência (IPS82 e CCT2221) foram agrupados em um *cluster* com coeficiente de correlação (r) ao redor de 0,70.

Empregando esta mesma técnica para outras espécies como *Klebsiella* (IZARD *et al.*, 1981), *Bordetella* e *Alcaligenes* (KERSTERS *et al.*, 1984), foi encontrado um coeficiente de correlação (r) alto (maior que 0,90). Comparando o nível de r para diferenciar B.t. pode-se considerar B.t.i. como espécie separada. Possivelmente, as bandas intensas de proteínas referentes aos cristais influenciam bastante na análise do *cluster*.

O cristal de B.t.i. é constituído de várias proteínas de 135, 128, 78 e 72 kD codificadas por quatro genes *cryIV* (A, B, C e D). Agregando-se a proteína de 27 kD (gene *cytA*) ocorre a formação de complexo ovóide durante a esporulação (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

As bandas de proteínas de alto peso molecular (135 e 128 kD) das linhagens de referências e isolados foram praticamente imperceptíveis.

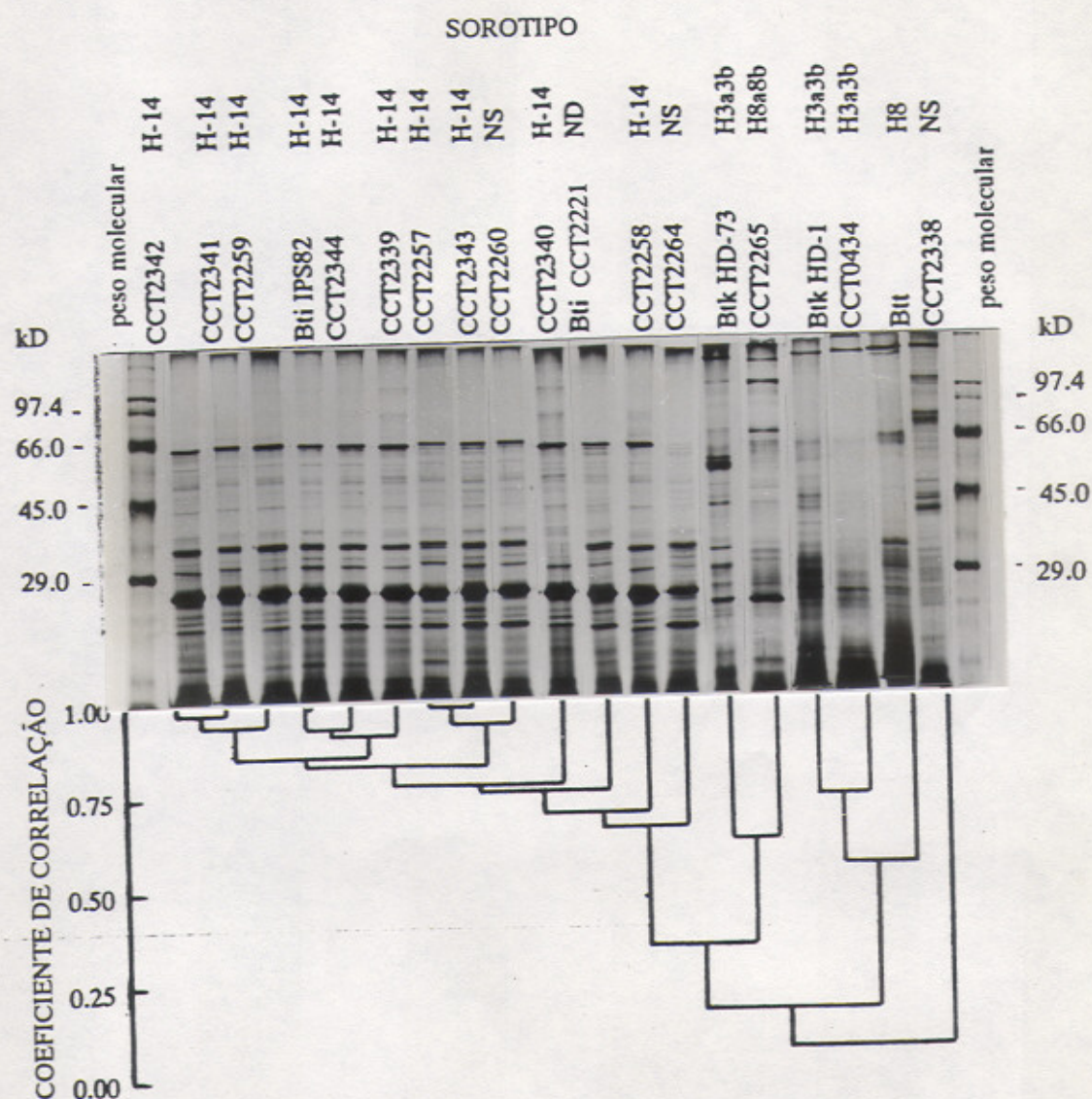


Figura 11. Perfis eletroforéticos de proteínas celulares solúveis totais de *Bacillus thuringiensis* e dendrograma correspondente.

CASTRO (1990) também não observou estas bandas. Foram detectadas apenas as bandas de proteínas de 68, 38, 28 e 17 kD em extrato de B.t.i., as quais devem corresponder às bandas de proteínas deste experimento, acrescentando-se valores de 3 a 4 kD em todos os pesos moleculares.

Embora os isolados CCT2260 e CCT2264 não tenham sido sorotipados com os 34 antisoros existentes no *Institut Pasteur*, o isolado CCT2260 apresentou alta homologia com os isolados CCT2257 e CCT2343 ($r=0,98$). Já o isolado CCT2264 apresentou coeficiente de correlação de 0,66 com as demais linhagens de B.t.i. e se diferenciou principalmente pela ausência da banda de 72 kD fortemente apresentada pelas demais linhagens de B.t.i.. Embora a proteína de 72 kD seja citada como relacionada com a produção de cristal, os resultados aqui obtidos sugerem que ela não deve ser essencial na atuação do efeito larvívica de *Aedes fluviatilis*. Somente o isolado CCT2340 não apresentou a banda de 36 kD.

O isolado CCT0434 (sorotipo H3a, 3b) apresentou alta similaridade ($r=0,74$) com a linhagem referência (B.t.k. HD-1) e distante da B.t.k. HD-73 ($r=0,18$), embora sejam pertencentes ao mesmo sorotipo. A linhagem B.t.k. HD-73 apresentou melhor semelhança com o isolado CCT2265 (sorotipo H8a, 8b) ($r=0,63$). É interessante salientar que ambas linhagens não causaram toxicidade ao *Aedes* enquanto que CCT0434 e B.t.k. HD-1 apresentaram toxicidade semelhante (item 2).

As linhagens de sorotipo H3a, 3b (B.t.k. HD-1, B.t.k. HD-73 e CCT0434), H8a, 8b (B.t.t. e CCT2265) e o isolado não sorotipado, apresentaram banda intensa de 130 e 23 kD (banda fraca apenas para CCT2338). Dentre estas linhagens, apenas B.t.k. HD-1, CCT0434 e B.t.t. não apresentaram banda de 110 kD. Além das bandas da linhagem B.t.k. HD-73 citadas acima, a Figura 11 ilustra várias outras bandas intensas de 66, 62, 55, 33 e 30 kD não observadas em outras linhagens.

O gene *cryII* codifica a proteína de 65 kD que forma inclusão cubóide em B.t.k. HD-1 (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Através da Figura 11 pode-se observar uma banda discreta de 65 kD no B.t.k. HD-1.

A proteína que confere a toxicidade a besouros de batatas Colorado indica ser de 72 kD (HÖFTE & WHITELEY, 1989), que pode corresponder à banda de 71 kD observada em B.t.t. (Figura 11).

Como foi dito anteriormente, as subespécies *morrisoni*, *tenebrionis* e *san diego* apresentam o mesmo sorotipo (H8a, 8b). Através do dendrograma da Figura 11, pode ser observado que o isolado CCT2265 não pode ser identificado como subespécie *tenebrionis* por ter apresentado coeficiente de correlação baixo ($r=0,18$) com a linhagem referência, sendo provavelmente *morrisoni*.

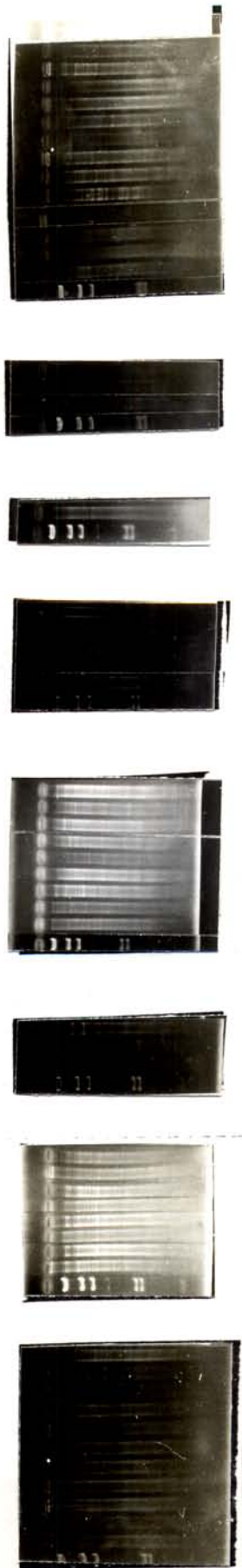
O isolado CCT2338, apesar de ter apresentado cristal não causou danos ao *Aedes* e não se relacionou com as demais linhagens citadas acima ($r=0,07$). OHBA & AIZAWA (1986) observaram que 64 % de isolados de B.t. de solos do Japão não apresentaram toxicidade a *Bombyx mori*, *Ae. aegypti* e *P. tibialis*. Através destes dados os autores acima sugerem que as bactérias com inclusões cristalinas não tóxicas podem estar distribuídas na natureza em maior proporção que as tóxicas. MEADOWS *et al.* (1992) relataram que 55 % de B.t. isolados de alimentos para animais no Reino Unido não apresentaram nenhuma toxicidade em lepidópteros e dípteros.

3. 4. 3. Polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLPs)

3. 4. 3. 1. Perfis de hibridização com o gene 16S rRNA

Os fragmentos do DNA genômico de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* obtidos com *HindIII* e separados por eletroforese em gel de agarose estão ilustrados na Figura 12. Esses fragmentos foram transferidos para membrana de nitrocelulose e hibridizados com a sonda marcada do gene 16S rRNA de *B. subtilis* S031 (Figura 13). O dendrograma obtido a partir destes dados indica certa correspondência com os diferentes sorotipos (Figura 14).

Todas as linhagens de referência designadas com prefixo "S" utilizadas neste trabalho, foram classificadas por taxonomia numérica (PRIEST *et al.*, 1988). É interessante notar que a distribuição das linhagens de B.t. e *B. cereus* por perfis de hibridização com o gene 16S rRNA corresponderam com a divisão dos sub-clusters da taxonomia numérica realizado pela equipe do Dr. Fergus G. Priest (Figura 14). Apenas o *entomocidus* demonstrou ser uma subespécie distante das demais enquanto que pela taxonomia numérica se enquadra no grupo 11G onde agrupam linhagens com sorotipo 4 e 1.



OBS.: as linhagens dos perfis de restrição correspondem aos indicados na Figura 13.

Figura 12. Fragmentos de DNA genômico de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* digeridos com *HindIII*.

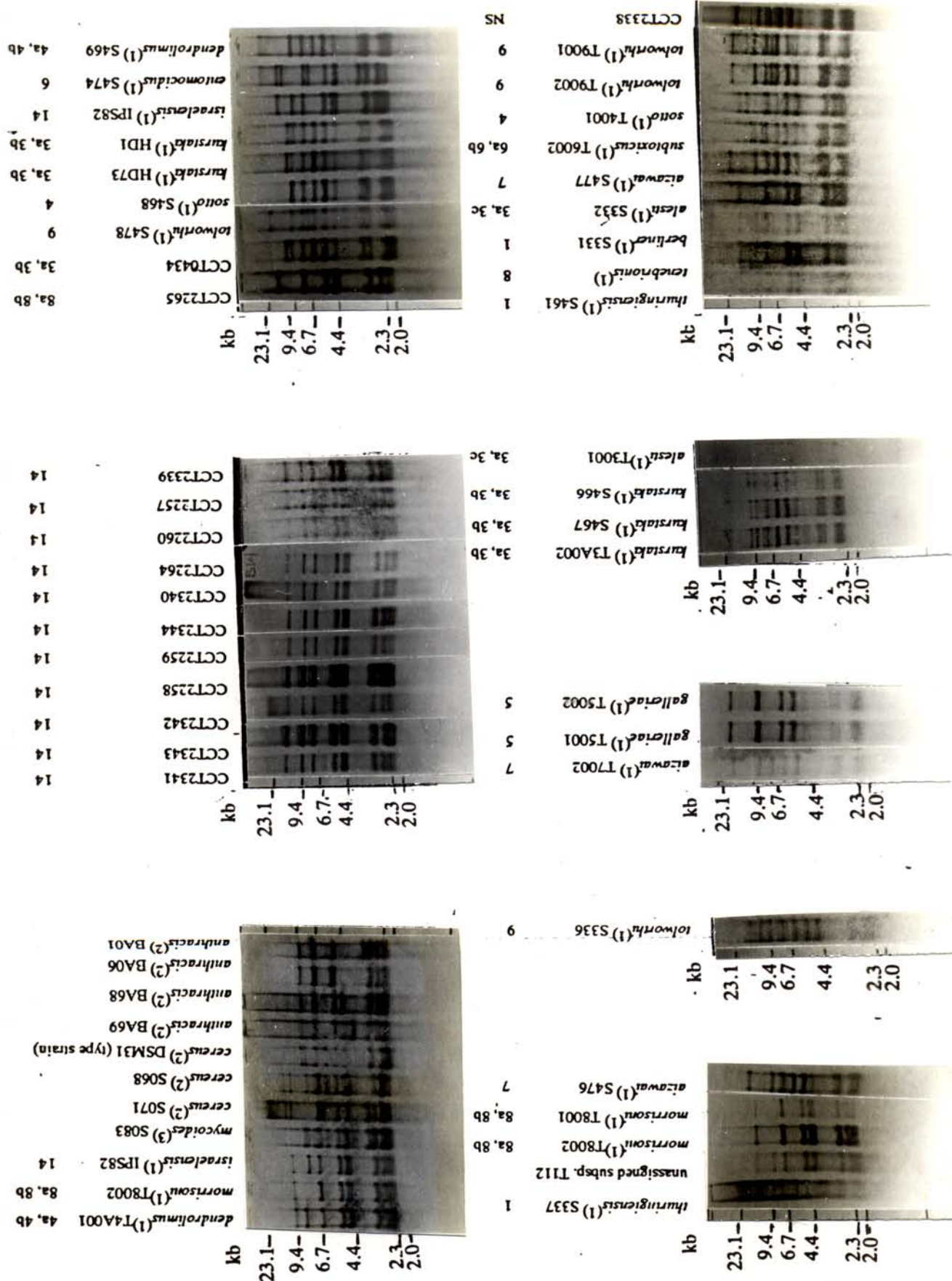


Figura 13. Hibridização dos DNAs genômico, digeridos com *Hind*III, de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* com sonda de 16S rRNA. (1), subespécie de *B. thuringiensis*; (2), espécie de *Bacillus*; (3), subespécie de *B. cereus*; NS, não sorotipado.

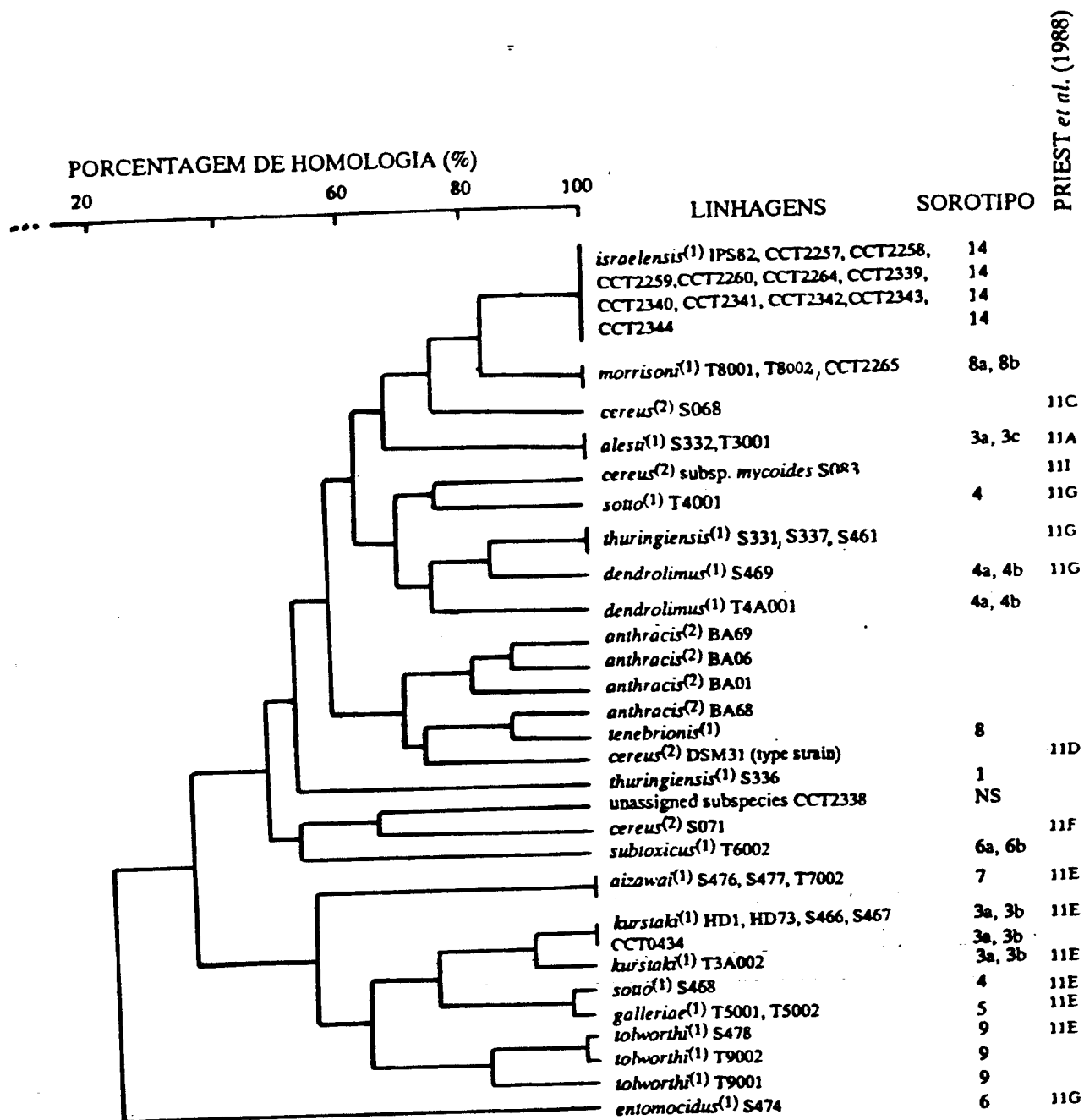


Figura 14. Dendrograma obtido da hibridização dos fragmentos de DNA, digeridos com *Hind*III, de *Bacillus anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* com sonda 16S rRNA.

A membrana hibridizada indica que as subespécies de B.t. apresentam grande variabilidade nos perfis dos genes rRNA. Estes perfis variaram de 6 a 11 bandas com peso molecular entre 2 a 23 kb e porcentagem de similaridade de 20 a 100 %. As linhagens de B.t. podem ser agrupadas em 3 *clusters* principais com homologia de até 40 %.

Todas as linhagens da subespécie *israelensis* apresentaram perfis de hibridização com o gene 16S rRNA idênticos com 8 bandas de hibridização. Da mesma forma resultou a subespécie *morrisoni*, porém com 7 bandas de hibridização. Ambas subespécies acarretam toxicidade a larvas de dípteros, porém o CCT2265 não demonstrou toxicidade ao *Aedes*. As subespécies *israelensis* e *morrisoni* apresentaram perfis de restrição do gene de 16S rRNA semelhantes (83% de homologia) diferenciando-se apenas pela ausência da banda de 9,8 kb no *morrisoni*. Estas linhagens se diferenciam também no teste de sorologia. O sorotipo da subespécie *israelensis* é H14 enquanto que a *morrisoni* é H8a, 8b, bem como, as subespécies *tenebrionis* e *san diego* (DE BARJAC & FRACHON, 1990).

A subespécie *morrisoni* pode ser distinguida da subespécie *tenebrionis* através dos perfis de hibridização com o gene 16S rRNA (58 % de homologia). Esta linhagem possui alguma similaridade com *B. anthracis* (pelo menos 70 %) e *Bacillus cereus* DSM31 (linhagem tipo) (73 %). Cada linhagem de *B. anthracis* apresentou bandas distintas na região de 5,8 a 3,3 kb. As bandas diferenciais das linhagens BA1, BA6, BA68 e BA69 foram de 3,4; 5,7; 4,8 e 4,1 kb respectivamente.

As subespécies *subtoxicus* e *entomocidus* tem sido descritas como idênticas por testes sorológicos (DE BARJAC & FRACHON, 1990) e padrões de esterase (DULMAGE *et al.*, 1981). Entretanto, os perfis de hibridização com o gene 16S rRNA indicaram que *entomocidus* é a subespécie mais distante das demais com apenas 20 % de homologia. PREFONTAINE *et al.* (1987) também comprovaram a distinção entre as subespécies *subtoxicus* e *entomocidus* através da hibridização com oligonucleotídeos específicos do gene δ -endotoxina de *B. thuringiensis*.

As subespécies *dendrolimus* e *sotto* foram classificadas como sendo a mesma subespécie pelos autores acima e por testes sorológicos (DE BARJAC & FRACHON, 1990). Os dados da Figura 14 indicaram também similaridade de 70 % entre *dendrolimus* e *sotto* T4001 sendo a subespécie *sotto* S468 atípica (34 %).

O isolado CCT0434 identificado como B.t.k. pela sorologia apresentou o mesmo perfil de hibridização com o gene 16S rRNA das outras linhagens de B.t.k. (HD-1, HD-73 e S466). Apenas uma linhagem *kurstaki* T3A002 apresentou-se ligeiramente diferente (90 % de homologia).

Os fragmentos do DNA genômico de *B. anthracis*, *B. cereus* e B.t.i. digeridos com *EcoRI* (Figura 15) foram também hibridizados com 16S rRNA marcado com Dig-UTP (Figura 16). Embora os perfis de hibridização do gene 16S rRNA com fragmentos de *HindIII* e *EcoRI* apresentem boa correspondência entre si, o último revelou maior diversidade.

A subespécie *morrisoni* se diferencia mais da *israelensis* em relação ao RFLP (digerido com *HindIII*) apresentando bandas de hibridização adicionais de 6,0 e 1,9 kb, porém a de 1, 3 kb se encontra ausente.

Todos B.t.i. mostraram o mesmo perfil de hibridização com o gene 16S rRNA (digestão com *EcoRI*) com 12 bandas de hibridização reforçando a similaridade na organização do gene rRNA.

A linhagem B.t.k. HD-1 apresentou mesmo RFLP da B.t.k. HD-73, porém com uma banda de hibridização extra de 4,3 kb.

Entre 4 linhagens de *B. anthracis* estudadas neste trabalho 2 mostraram RFLPs idênticos. A linhagem BA1 apresentou uma banda adicional de 7,2 kb e a linhagem BA68 exibiu uma banda de 7,8 kb ao invés de 6,0 kb observadas nas outras linhagens de *B. anthracis*. Esta linhagem atípica tem mostrado maior semelhança com *B. cereus* DSM31 (73 %) e com a subespécie *tenebrionis* (88 %) do que em relação a outras linhagens *anthracis* (70 %) pelo RFLPs com *HindIII*. Outras linhagens de *B. cereus* usadas neste estudo apresentaram dispersas entre as diversas linhagens de *B. thuringiensis*. Análises de taxonomia numérica revelaram que estas mesmas linhagens de *B. cereus* podem ser alocadas em sub-*clusters* diferentes (PRIEST *et al.*, 1988).

Através da análise de seqüências de 16S rRNA, a linhagem de *B. cereus* (tipo) e *B. anthracis* foram consideradas como mesma espécie. Outras linhagens de *B. cereus* se diferenciam das demais linhagens em apenas um par de base (ASH *et al.*, 1992).

O isolado CCT2338 não identificado pela sorologia e testes anteriores, apresentou certa similaridade com *B. cereus* S74 (63 %).



OBS.: as linhagens dos perfis de restrição correspondem aos indicados na Figura 16.

Figura 15. Fragmentos de DNA genômico de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* obtidos com *EcoRI*.

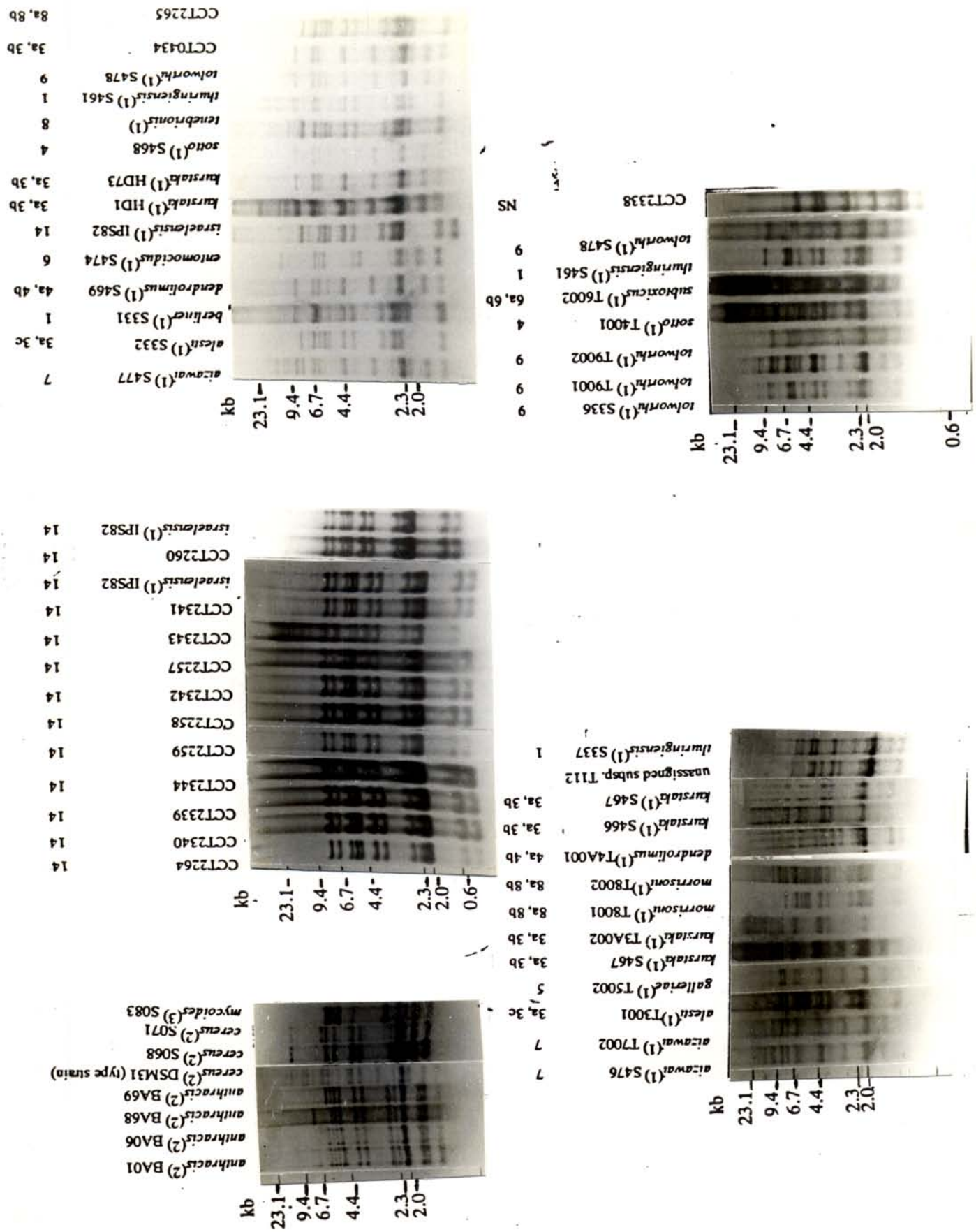


Figura 16. Hibridização dos DNAs genômico, digeridos com *EcoRI*, de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* com sonda de 16S rRNA. (1), subespécie de *B. thuringiensis*; (2), espécie de *Bacillus*; (3), subespécie de *B. cereus*; NS, não sorotipado.

3. 4. 3. 2. Hibridização com sonda do gene do cristal 130 kD do B.t.i. IPS 82

A hibridização *Southern blotting* foi realizada com linhagens de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* usando genes *cryIVA* e *cryIVB* de B.t.i. IPS82 como sonda (Figura 8b). Pelo menos uma linhagem de cada subespécie de *B. thuringiensis* foi escolhida para este experimento (Tabela 4).

As linhagens não pertencentes a subespécie *israelensis* não apresentaram nenhuma hibridização com a sonda do gene toxigênico de B.t.i. (dados não mostrados). A hibridização com o gene do cristal foi observada somente com o próprio DNA da linhagem de referência (B.t.i. IPS82) e de isolados identificados previamente neste trabalho como B.t.i. (Figura 17). Isto evidencia a especificidade da sonda molecular utilizada e a diferenciação desta com as toxinas de outras subespécies.

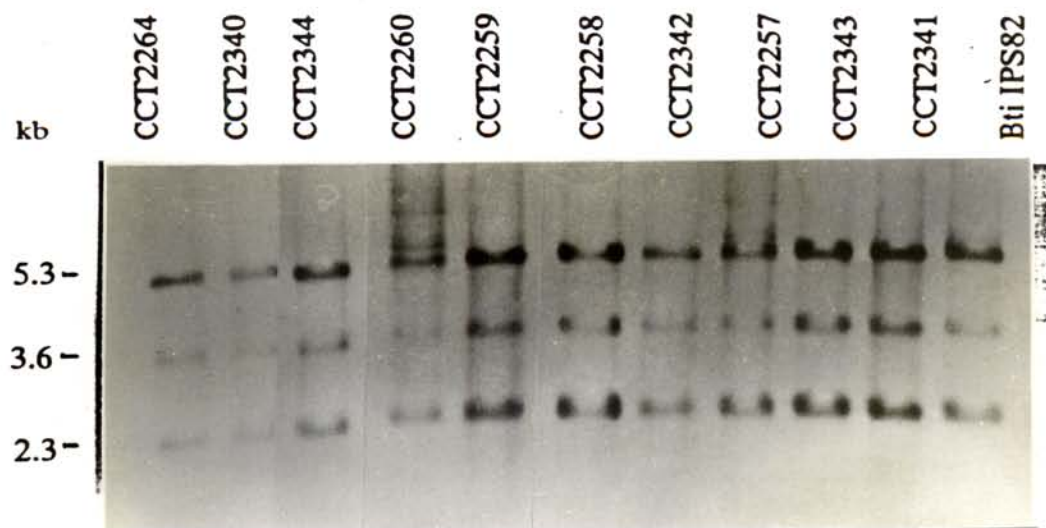
Os fragmentos de DNA obtidos por *EcoRI* e *HindIII* apresentaram 2 (11,0 e 9,4 kb) e 3 (5,3; 3,6 e 2,3 kb) bandas de hibridização respectivamente. Apenas a linhagem CCT2257 apresentou uma banda extra de 14,8 kb (digerido com *EcoRI*), provavelmente devido a digestão incompleta.

3. 4. 4. Perfis de restrição do gene toxigênico digeridos com *Sau3AI*.

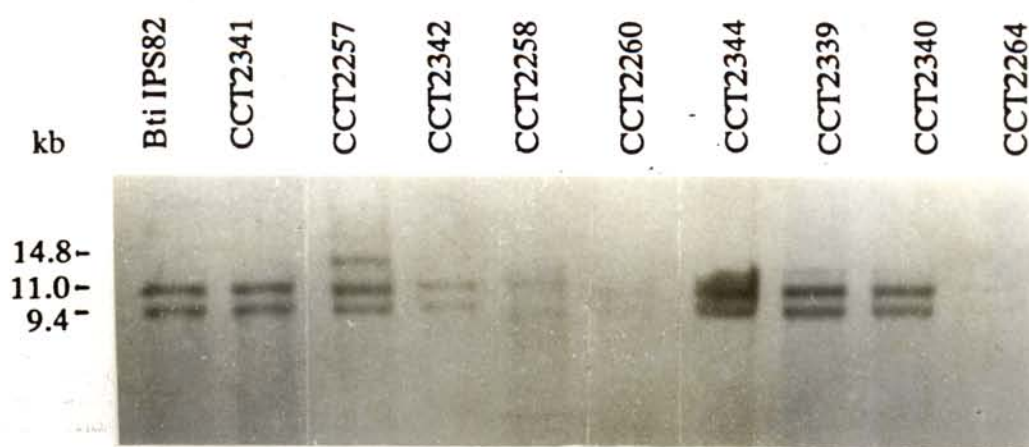
Em geral, os genes responsáveis pela produção de toxina de B.t.i. são plasmidiais (PRIEST, 1992). Como a extração de plasmídio de B.t.i. não é obtida com facilidade, além de consumir longo tempo de manuseio, optou-se em amplificar o gene toxigênico referente ao cristal 130 kD de B.t.i. e observar o perfil de restrição do gene toxigênico.

CAROZZI *et al.* (1991) produziu duas sondas moleculares de *cryIVA* e *cryIVB* de 0,8 e 1,3 kb com os seguintes pares de oligodeoxinucleotídeos como *primers* Dip-1A & Dip-1B e Dip-2A & Dip2B respectivamente.

Ao invés de amplificar parte pequena da toxina de B.t.i. como CAROZZI *et al.* (1991) optou-se produzir sonda de tamanho maior (PM = 2,6 kb), escolhendo os *primers* Dip2A e Dip1B (Apêndice) mencionados pelos mesmos autores citados acima.



(a)



(b)

Figura 17. Hibridização dos fragmentos de DNA genômico, digeridos com (a) *Hind*III e (b) *Eco*RI, de B. t. i. com a sonda do gene toxigênico de B.t.i. IPS 82.

As linhagens de referência B.t.i. IPS82 e todos os isolados identificados como B.t.i. pelo perfil eletroforético de proteínas celulares totais, testes sorológicos e perfil de restrição do gene 16S rRNA foram submetidos a reação em cadeia de polimerase com os *primers* de oligonucleotídeos do gene do cristal 130 kD (*cryIVA* e *cryIVB*).

A amplificação deste gene toxigênico (Figura 18a) produzindo fragmentos de mesmo peso molecular são indicativos de que provavelmente a sequência de DNA toxigênico são idênticas.

A partir do conhecimento da sequência do gene toxigênico de B.t.i. fornecida por CHUNGJATUPORNCHAI *et al.* (1988) (Figura 1, Apêndice), este foi analisado pelo programa *Sequaid* que indicou 10 fragmentos possíveis com a digestão de *Sau3AI* (62, 69, 75, 85, 180, 186, 249, 432, 555 e 717 bp).

Não foi possível a detecção dos 10 fragmentos *Sau3AI*, devido provavelmente à digestão incompleta ou à falta de definição dos fragmentos menores. Embora o peso molecular de cada fragmento não pode ser determinado adequadamente após digestão devido à ausência de padrões de peso molecular mais precisos, provavelmente as bandas apresentadas na Figura 18b correspondem aos valores de 717, 555, 432, 249 e 186 kb. Uma banda extra de 600 kb pode ser observada em intensidade menor em relação a demais bandas, principalmente no isolado CCT2340, o que indica ser digestão parcial que pode conter os fragmentos de baixo peso molecular não visualizados (180, 85, 75, 69 e 62).

Embora a Figura 18b exiba apenas 6 bandas com *Sau3AI*, todas as linhagens de B.t.i. mostraram o mesmo perfil de fragmentos de restrição confirmando os resultados anteriores de que o B.t.i. é um grupo bastante homogêneo com sequências altamente conservadas para o gene da toxina.

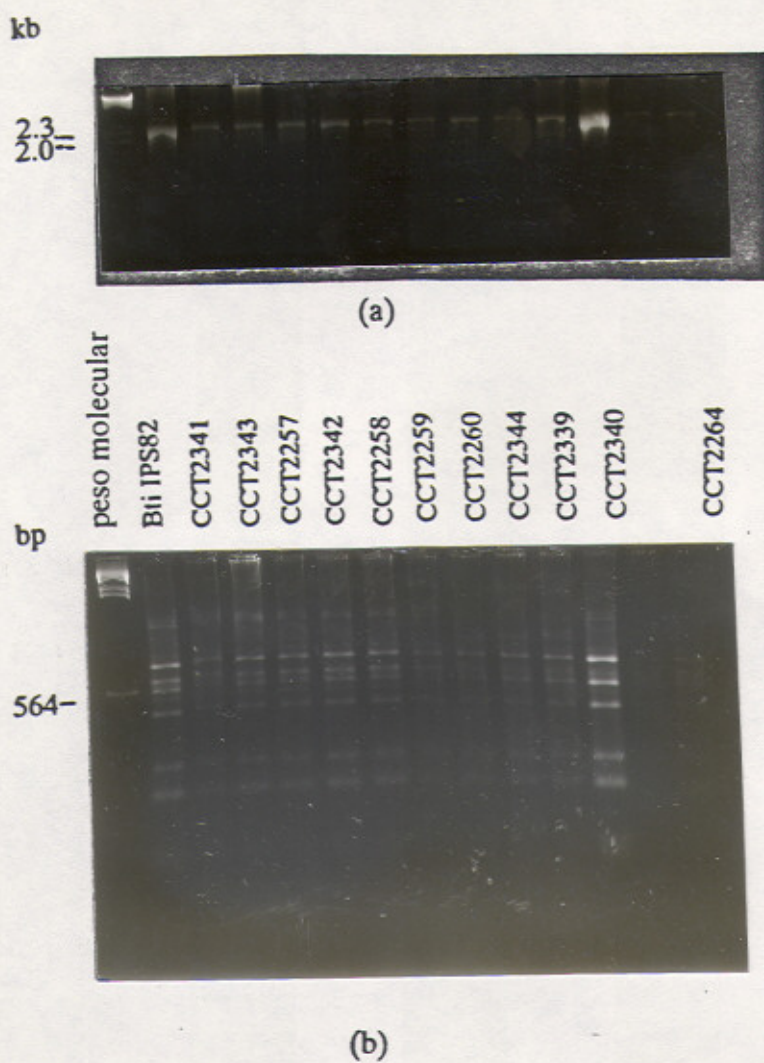


Figura 18. Produtos de PCR do (a) gene do cristal (b) digerido com *Sau3AI*.

CONCLUSÕES

1. O isolado CCT2261 foi identificado como sendo *B. sphaericus* através de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Testes de atividade larvicida, fagotipagem (fagotipo 3) e sorologia (H 5) indicaram similaridade com a linhagem referência 2362. Porém, perfis eletroforéticos de proteínas celulares totais revelam semelhança maior com a linhagem SSII-1 ($r=0,88$) do que com a linhagem 2342 ($r=0,72$).

(2) Enquanto o *B. sphaericus* não apresentou nenhuma atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro, o B.t. apresentou resultados diferenciais (halo α ou β). Este teste indicou ser bastante simples e rápido para o processo de identificação de linhagens de B.t..

(3) O perfil eletroforético de proteínas celulares totais demonstrou que 9 isolados com sorotipo H14 e dois isolados não sorotipados com os antisoros existentes podem ser identificados como subespécie *israelensis*. Estas linhagens podem ser distinguidas de linhagens referências tóxicas a lepidópteras e coleópteras. Em vista disto, a eletroforese de proteínas celulares totais de B.t. pode ser um método alternativo para identificação de *B. thuringiensis*.

(4) Através de perfis eletroforéticos de proteínas totais, o isolado CCT0434 revelou alta similaridade com o B.t.k. HD-1 ($r = 0,74$) enquanto que os perfis de hibridização com o gene 16S rRNA indicaram ser linhagens idênticas.

(5) Apesar do isolado CCT2265 e a linhagem de referência B.t.k. HD-73 possuírem sorotipos diferentes (H8a, 8b e H3a, 3b respectivamente), estas apresentaram certa similaridade observada pela não toxicidade ao *Aedes* e perfis eletroforéticos de proteínas totais ($r = 0,63$). Esta técnica revelou também que a linhagem referência B.t.t. com mesmo sorotipo do isolado (H8a, 8b) foi bastante diferente do isolado, indicando pertencer à *morrisoni*. O isolado CCT2265 pode ser confirmado como pertencente à subespécie *morrisoni*, uma vez que os perfis de hibridização com o gene 16S rRNA foram idênticos aos das referência T8001 e T8002.

(6) Apesar do isolado CCT2338 não causar danos a larvas de *Aedes*, não precipitar com nenhum dos antisoros do *Institut Pasteur* e não apresentar boa similaridade com as demais linhagens, este pode apresentar toxicidade a outras famílias ou gêneros de larvas devido a atividade hemolítica tipo (α), semelhante ao observado a linhagens com sorotipo H3a,3b (tóxicas a lepidópteros).

(7) Os isolados identificados a nível de subespécie como *israelensis* (B.t.i.) por sorologia e/ou perfis eletroforéticos de proteínas totais revelaram os mesmos RFLPs (perfis de hibridização com o gene 16S rRNA e com o gene do cristal do B.t.i.). Também os perfis de restrição do gene toxigênico digerido com *Sau3AI* revelaram serem idênticos. Diante destes resultados, há indicações de que o B.t.i. é uma subespécie bastante homogênea e com seqüências do gene da toxina altamente conservadas o que permite diferenciá-los dos demais B.t..

(8) A sonda do gene do cristal de B.t.i. demonstrou ser bastante específico para as linhagens de B.t.i, indicando ser eficiente na utilização como sonda para identificação de B.t.i..

(9) A distribuição das linhagens de B.t. apresentaram correspondência aos testes sorológicos (DE BARJAC & FRACHON, 1990) e *clusters* de taxonomia numérica (PRIEST *et al.*, 1988). As linhagens *B. cereus* e *B. anthracis* encontram-se dispersas entre as linhagens de *Bacillus thuringiensis*. Isto indica que estas linhagens são muito próximas e que podem ser consideradas como mesma espécie do ponto de vista taxonômico.

APÊNDICE

1. Abreviaturas

bp	pares de bases
B.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i>
B.t.i.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
B.t.k.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
B.t.m.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>
B.t.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>
C ₅₀	concentração letal de 50 % de larvas.
CCT	Coleção de Culturas Tropical
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucléosídeo 5'-trifosfato
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
dUTP	desoxiuridina 5'-trifosfato
Dig	digoxigenina
EDTA	ácido etilenodiaminatetracético
g	grama
kb	10 ³ pares de bases
kD	10 ³ Dalton
l	litro
log	logarítmo da base 10
M	concentração Molar
mA	10 ³ Ampere
µg	micro (10 ⁻⁶) grama
µl	micro (10 ⁻⁶) litro
mg	mili (10 ⁻³) grama
mM	mili (10 ⁻³) mol
min	minuto
ml	mili (10 ⁻³) litro

pmol	pico (10 ⁻¹²)mol
M _r	peso molecular padrão de proteínas
PAGE	gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
p.m.	peso molecular
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Chain Reaction Polymerase</i>)
p/v	peso/volume
r	coeficiente de correlação <i>Pearson Product Moment</i>
R _f	distância de migração de proteínas/DNA
RFLP	polimorfismo dos fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragments Length Polymorphisms</i>)
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
RNase	ribonuclease
S	coeficiente de sedimentação de Svedberg
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecil sulphate</i>)
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetano
U	Unidade de atividade enzimática
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UPGMA	Método de agrupamento em pares sem atribuição de peso, usando médias algorítmicas (<i>Unweighted Pair Group Method using Algorithm</i>).

2. A composição dos meios de cultura utilizados nos (1) testes de identificação e caracterização e (2) extração de DNA de *Bacillus* estão descritos a seguir:

1. Ágar nutriente⁽¹⁾:

peptona	5 g/l
extrato de carne	3 g/l
ágar	15 g/l

2. Meio de fermentação⁽¹⁾:

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,0 g/l
KCl	0,2 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
extrato de levedura	0,2 g/l
ágar	15 g/l

O pH foi ajustado a 7,0. Após a esterilização, foi adicionado 15 ml de púrpura de bromocresol 0,04 % e açúcar teste na concentração final de 0,5 %.

3. Crescimento a pH 5,7

(a) Ágar Bacto dextrose de *Sabouraud*

neopeptona	10 g/l
dextrose	40 g/l
ágar	15 g/l
pH 5,6	

(b) Caldo Dextrose de *Sabouraud*

neopeptona	10 g/l
dextrose	20 g/l
pH 5,7	

4. Meio modificado⁽¹⁾:

triptona	10,0 g/l
extrato de levedura	1,0 g/l
glicose	10,0 g/l
púrpura de bromocresol	0,04 g/l

ágar	20,0 g/l		
pH	7		
5. Caldo de glicose ⁽¹⁾ :			
peptona	5 g/l		
K ₂ HPO ₄	5 g/l		
glicose	5 g/l		
Ajuste de pH	7		
6. Meio de Citrato de <i>Simmon</i>			
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g/l		
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	1,0 g/l		
NaCl	5,0 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,0 g/l		
citrato de sódio	2,0 g/l		
ágar	15,0 g/l		
azul de bromotimol	0,08 g/l		
7. <i>Christensen</i> ⁽¹⁾			
peptona	1,0 g/l		
NaCl		5,0 g/l	
KH ₂ PO ₄	2,0 g/l		
glicose		1,0 g/l	
uréia (20 %)		20,0 g/l	
vermelho de fenol	0,012 g/l		
ágar		15,0 g/l	
8. Caldo/Ágar NYSM ⁽¹⁾			
caldo nutriente	conforme instruções do fabricante		
extrato de levedura	0,05 %		
MnCl ₂	5 x 10 ⁻⁵ M		
CaCl ₂	7 x 10 ⁻⁴ M		
MgCl ₂	5 x 10 ⁻³ M		

8. Sal de *Spizizen* (2):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g/l
K_2HPO_4	14,0 g/l
KH_2PO_4	6,0 g/l
citrato trisódico.2 H_2O	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
FeCl_3	10^{-4} M
CaCl_2	10^{-4} M
ZnCl_2	10^{-4} M
MnCl_2	10^{-4} M

ATGAATTCAGGCTATCCGTTAGCGAATGACTTACAAGGGTCAATGAAAAACACGAACTATAAAGATTGGCTAGCCA
 TGTGTGAAAATAACCAACAGTATGGCGTTAATCCAGCTGCGATTAATCTTCTTCAGTTAGTACCGCTTTAAAAGTA
 GCTGGAGCTATCCTTAAATTTGTAAACCCACCTGCAGGTACTGTCTTAACCGTACTTAGCGCGGTGCTTCCTATTCT
TTGGCCGACTAATACTCCAACGCCTGAAAGAGTTTGAATGATTTTCATGACCAATACAGGGAATCTTATTGATCAA
 ACTGTAACAGCTTATGTACGAACAGATGCAAAATGACGGTTGTGAAAGATTATTTAGATCAATATACAA
 CTAAATTTAACACTTGGAAGAGAGAGCTAATAACAGTCTATAGAACAGCAGTAATAACTCAATTTAACTTAAC
 CAGTGCCAAACTTCGAGAGACCGCAGTTTATTTAGCAACTTAGTAGGTTATGAATTATTGTTATTACCAATATACG
 CACAAGTAGCAAAATTTCAATTTACTTTTAATAAGAGATGGCCTCATAAATGCACAAGAATGGTCTTTAGCACGTAG
 TGCTGGTGACCAACTATATAACTATGGTGCAGTACACTAAAGAATATATTGCACATAGCATTACATGGTATAAT
 AAAGGTTTAGATGTACTTAGAAATAAATCTAATGGACAATGGATTACGTTTAAATGATTATAAAAGAGAGATGACTA
 TTCAAGTATTAGATATACTCGCTCTTTTGGCAGTTATGATCCACGTCGATACCGTGGGACAAAATAGATAATACG
 AAATATCAAAAAACAGAATTTACAAGAGAGATTTATACAGCTTTAGTAGAATCTCCTTCTAGTAAATCTATAGCAG
 CACTGGAGGCAGCACTTACACGAGATGTTCAATTTATTCACCTGGCTAAAGAGAGTAGATTCTGGACCAATACTAT
 ATATCAAGATTTAAGATTTTATCTGCCAATAAAATTTGGGTTTTTCATATACAAATCTTCTGCAATGCAAGAAAGTG
 GAATTTATGGAAGTTCTGGTTTTGGTTCAAATCTTACTCATCAAATTCAACTTAATTCTAATGTTTATAAACTTCTA
 TCACAGATACTAGCTCCCCCTCTAATCGAGTTACAAAAATGGATTTCTACAAAATTGATGGTACTCTTGCTCTTAT
 AATTCAAATATAACACCAACTCCTGAAGGTTTAAAGGACCACATTTTTTGGATTTTCAACAAATGAGAACACACCTA
 ATCAACCAACTGTAAATGATTATACGCATATTTTAAAGCTATATAAAAACTGATGTTATAGATTATAACAGTAACAG
 GGTTTTCAATTTGCTTGACACATAAGATTGTTGACCTAATAATCAAATATACACAGATGCTATCACACAAGTTCCGG
 CCGTAAAAATCTAACTTCTTGAATGCAACAGCTAAAGTAATCAAGGGACCTGGTCATACAGGGGGGGATCTAGTTGC
 TCTTACAAGCAATGGTACTCTATCAGGCAGAATGGAGATTCAATGTAAAAACAAGTATTTTTAATGATCCTACAAGA
 AGTTACGGATTACGCATACGTTATGCTGCAAATAGTCCAATTGTATTGAATGTATCATATGTATTACAAGGAGTTTC
 TAGAGGAACAACGATTAGTACAGAATCTACGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACCTACAGATTTAAAATATGAA
 GAGTTTAGATACAAAGATCCTTTTGTATGCAATTGTACCGATGAGATTATCTTCTAATCAACTGATACTATAGCTAT
 TCAACCATTAACATGACTTCAAATAATCAAGTGATTATTGACAGAATCGAAATTATTCCAATCACTCAATCTGTAT
 TAGATGAGACAGAGAACCAAAATTTAGAATCAGAACGAGAAGTTGTGAATGCACTGTTTACAAATGACGCGAAAG
 ATGCATTAACATTGGAACGACAGATTATGACATAGATCAAGCCGCAAATCTTGTGGAATGTATTTCTGAAGAATT
 ATATCCAAAAGAAAAAATGCTGTTATTAGATGAAGTTAAAAATGCGAAACAACCTTAGTCAATCTCGAAATGTACTT
 CAAAACGGGGGATTTTGAATCGGCTACGCTTGGTTGGACAACAAGTGATAATACAAATTCAAGAAGATGATCCTA
 TTTTAAAGGGCATTACCTTCATATGTCTGGGGCGAGAGACATTGATGGTACGATATTTCCGACCTATATATTCCAA
 AAAATTGATGAATCAAAATTTAAACCGTATACACGTTACCTAGTAAGGGGATTTGTAGGAAGTAGTAAAGATGTAG
 AACTAGTGGTTTCACGCTATGGGGAAGAAATTTGATGCCATCATGAATGTTCCAGCTGATTTAACTATCTGTATCCT
 TCTACCTTTGATTGTGAAGGGTCTAATCGTTGTGAGACGTCGCTGTGCCGGCTAACATTGGGAACACTTCTGATAT
 GTTGATTTCATGCCAATATGATACAGGGAAAAAGCATGTCGTATGTCAGGATTCCCATCAATTTAGTTTCACTATTG
 ATACAGGGGCATTAGATACAAATGAAAATATAGGGGTTTGGGTCATGTTTAAATATCTTCTCCAGATGGATACGC
 ATCATTAGATAATTTAGAAGTAATTGAAGAAGGGCCAATAGATGGGGAAGCACTGTACGCGTGAAACACATGGA
 GAAGAAATGGAACGATCAAATGGAAGCAAAACGTTTCGAAACACAACAAGCATATGATGTAGCGAAACAAGCCAT
 TGATGCTTTATTCACAAATGTACAAGATGAGGCTTTACAGTTTGATACGACACTCGCTCAAATTCAGTACGCTGAGT
 ATTTGGTACAATCGATTCCATATGTGTACAATGATTGGTTGTCAGATGTTCCAGGTATGAATTATGATATCTATGTA
 GAGTTGGATGCACGAGTGGCACAAGCGGCTTATTTGTATGATACAAGAAATATTATTAATAAATGGTGATTTTACAC
 AAGGGGTAATGGGGTGGCATGTAATGGAATGCAGACGTACAACAAATAGATGGTGTTTCTGTATTGGTTCTATC
 TAATTGGAGTGCTGGCGTATCTCAAATGTCCATCTCCAACATAATCATGGGTATGTCCTACGTGTTATTGCCAAAA
 AAGAAGGACCTGGAATGGGTATGTCACGCTTATGGATTGTGAGGAGAATCAAGAAAAATTGACGTTTACGTCTTG
 TGAAGAAGGATATATTACGAAGACAGTAGATGTATCCAGATACAGATCGTGACGAATTGAGATAGCGGAAAC
 CGAAGGTTCTGTTTATATCGAAAGCATTGAATTAATTTGCATGAACGAGTGA

Figura 19. Sequência do gene toxigênico referente ao cristal 130 kDa do B.t.i.
 (CHUNGJATUPORNANCHAI et al., 1988). □ primer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANG, M. J.; STAVES, M. J.; ROCHELEAU, T. A.; LEIGHTON, J.; BARKER, R. F. & THOMPSON, D. V. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene*, **36**: 289-300, 1985.
- ALEXANDER, B. & PRIEST, F. G. Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. *Journal of General Microbiology*, **136**: 367-376, 1990.
- ANDRADE, C. F. S. *Ecologia de supressão de populações de culicídeos e simúlideos*. Campinas, Ciências Biológicas. 1989. 253p. Tese (doutor) - Universidade Estadual de Campinas.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W. & DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*, **50** (1): 1-24, 1986.
- ARONSON, A. I.; HAN, E.-S.; MC GAUGHEY, W. & JOHNSON, D. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (4): 981-986, 1991.
- ASH, C.; FARROW, J. A. E. ; DORSCH, M.; STACKEBRANDT, E.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequence of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41** (3): 343-346, 1991.
- AUSTIN, B. & PRIEST, F. G. *Modern Bacterial Taxonomy*. Bradford-on-Avon, Wiltshire, Billing & Sons. Ltd. Worcester, 1986.
- BAR, E.; LIEMAN-HURWITZ, J.; RAHAMIN, E.; KEYMAN, A. & SANDLER, N. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis israelensis* δ -endotoxin DNA in *B. sphaericus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **57** (2): 149-158, 1991.
- BARRY, T; POWELL, R. & GANNON, F. A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Bio/Technology*, **8**: 233-236, 1990.

- BARTON, D. A.; WHITELEY, H. R. & YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.*, **85**: 1103-1109, 1987.
- BAUMANN, P.; UNTERMAN, B. M.; BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; ABBENE, S. J. & BOWDITCH, R. D. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular weight precursors. *Journal of Bacteriology*, **163** (2): 738-747, 1985.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; BOWDITCH, R. D. & BROADWELL, A. H. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences. *Journal of Bacteriology*, **169** (9): 4061-4067, 1987.
- BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H. & BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9- kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *Journal of Bacteriology*, **170** (5): 2045-2050, 1988.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99, 1987.
- BOURQUE, S. N.; VALÉRO, J. R.; MERCIER, J.; LAVOIE, M. C. & LEVESQUE, R. C. Multiple polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (2): 523-527, 1993.
- BROADWELL, A. H. & BAUMANN, P. Sporulation-associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicide. *Applied and Environmental Microbiology*, **52** (4): 758-764, 1986.
- BROADWELL, A. H.; BAUMANN, L. & BAUMANN, P. The 42- and 51- kilodalton mosquitocidal proteins of *Bacillus sphaericus* 2362: construction of recombinants with enhanced expression and in vivo studies of processing and toxicity. *Journal of Bacteriology*, **172** (5): 2217-2223, 1990.
- BROUSSEAU, R.; SAINT-ONGE, A.; PRÉFONTAINE, G.; MASSON, L. & CABANA, J. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (1): 114-119, 1993.
- BROWN, K. L. & WHITELEY, H. R. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *Journal of Bacteriology*, **174** (2): 549-557, 1992.

- BULLA JR., L. A.; BECHTEL, D. B.; KRAMER, K. J.; SHETHNA, Y. I.; ARONSON, A. I. & FITZ-JAMES, P. C. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 147-204, 1980.
- CALABRESE, D. M.; MICKERSON, K. W. & LANE, L. C. A comparison of protein crystal subunit sizes in *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1006-1010, 1980.
- CANHOS, V. P. *Microorganisms isolated from sand filtered by water and the proteolytic activity of a Flavobacterium isolate*. Oregon, U.S.A., 1980. Tese (doutor) Oregon State University.
- CARLTON, B. C. & GONZÁLEZ JR., J. M. Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. In: HOCH, J. A. & SETLOW, P. *Molecular Biology of Microbial Differentiation*. Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1985. p. 246-252.
- CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S. & KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (11): 3057-3061, 1991.
- CASTRO, R. M. C. *Clonagem molecular e expressão dos genes do cristal protéico de Bacillus thuringiensis subsp. israelensis em Escherichia coli*. Campinas, Ciências Biológicas. 1990. 101p. Tese (mestr) - Universidade Estadual de Campinas.
- CHANG, C.; YU, Y-M.; DAI, S-M.; LAW, S. K. & GILL, S. S. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (3): 815-821, 1993.
- CHARLES, J. F. & DE BARJAC, H. Sporulation et crystallogenese de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopie électronique. *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)*, **133A**: 425-442, 1982.
- CHILCOTT, C. N.; KALMAKOFF, J. & PILLAI, J. S. Neurotoxic and haemolytic activity of a protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**: 259-263, 1984.
- CHILCOTT, C. N. & ELLAR, D. J. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *Journal of General Microbiology*, **134**: 2551-2558, 1988.

- CHILCOTT, C. N.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. & DROBNIEWSKI, F. A. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body. In: DE BARJAC, H. & SUTHERLAND, D. J. eds. *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies*. New Brunswick, Rutgers University Press, 1990. p. 45-65.
- CHUNGJATUPORNCHAI, W.; HÖFTE, H.; SEURINCK, J.; ANGSUTHANASOMBAT, C. & VAECK, M. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. *Eur. J. Biochem.*, **173**: 9-16, 1988.
- CLAUS, D. & BERKELEY, R. C.W. Genus *Bacillus*. Cohn 1872. In: SNEATH, P. H. A. *et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, editora Williams & Wilkins, 1986. 9ª. ed., v. 2, Section 13, p.1105-1141.
- CLAUS, D. & FRITZE, D. Taxonomy of *Bacillus*. In: HARWOOD, C. R. ed. *Biotechnology handbooks 2 Bacillus*, N. York, Plenum Press, 1989, v.2, p. 5-26.
- CRUEGER, W. & CRUEGER, A. Other fermentation processes and future prospects. In: BROCK, T. D. *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Madison, U. S. A. Science Tech., Inc., 1984. p. 295-297.
- DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W. P. & JANY, C. S. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Molecular Microbiology*, **4** (12): 2087-2094, 1990.
- DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R. & DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos Anophelinos das regiões nordestina e Amazônica do Brasil. *Rev. Ser. Esp. Saúde Pub.*, **1**: 827-965, 1984.
- DE BARJAC, H.; LARGET-THIÉRY, I.; DUMANOIR, V. C. & RIPOUTEAU, H. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains on the basis of toxicity to mosquito larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **21** (½): 85-90, 1985.
- DE BARJAC, H. & FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* **35** (2): 233-240, 1990.
- DE MURO, M. A. *Bacillus cereus: caracterização bioquímica e sorológica, e avaliação da toxicidade de cepas isoladas de alimentos envolvidos ou não em casos de intoxicação alimentar*. Campinas, SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1988. 102p. Tese (mestr) - Universidade Estadual de Campinas.

- DE MURO, M.; MITCHELL, W. J. & PRIEST, F. G. Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *Journal of General Microbiology*, **138**: 1159-1166, 1992.
- DONOVAN, W. P.; RUPAR, M. J.; SLANEY, A. C.; MALVAR, T.; GAWRON-BURKE, M. C. & JOHNSON, T. B. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (12): 3921-3927, 1992.
- ELLAR, D. J.; KNOWLES, B. H.; HAIDER, M. Z. & DROBNIEWSKI, F. A. Investigation of the specificity, cytotoxic mechanisms and relatedness of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins from different pathotypes. In: FALMAGNE, P.; ALOUF, J. E.; FEHRENBACH, F. J.; JELIASZEWICZ, J. & THELESTAM, M. eds. *Bacterial protein toxins*. Stuttgart, Gustav Fisher, 1986. p. 41-48.
- FISCHHOFF, D. A.; BOWDISCH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; MC CORMICK, S. H.; 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* **5**: 807-813, 1987.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J. & KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/technology* **10**: 271-275, 1992.
- Folha de São Paulo, 8.12..90 - "cidades" C-3.
- GALLO, C. R. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica*. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1989. 388p. Tese (doutor) - Universidade Estadual de Campinas.
- GOLDBERG, L. H. & MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, **37**: 355-358, 1977.
- GONZÁLEZ JR., J. M.; DULMAGE, H. T. & CARLTON, B. C. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **5**: 351-365, 1981.
- GONZÁLES JR., J. M.; BROWN, B. J. & CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta- endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 6951-6955, 1982.

- GORDON, R.E. The genus *Bacillus*. In: GORDON, R. E., HAYNES, W. C. & PANG, C. H. - N. eds., *The genus Bacillus*. (Agricultural Handbook n° 427). Washington DC: United States Department of Agriculture, 1973, 155p.
- HARWOOD, C. R. Introduction to the Biotechnology of *Bacillus*. In: HARWOOD, C. R. ed. *Biotechnology handbooks 2 Bacillus*, N. York, Plenum Press, 1989. v.2, p. 1-4.
- HELD, G. A.; BULLA JR., L. A.; FERRARI, E.; HOCH, J. A.; ARONSON, A. I. & MINNICH, S. A. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 6065-6069, 1982.
- HERRNSTADT, C.; GILROY, T.E.; SOBIESKI, D. A; BENNETT, B.D. & GAERTNER, F. H. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene*, **57**: 37-46, 1987.
- HOEFER electrophoresis catalog and exercises, 1990-1991.
- HOFFMAN, C.; LÜTHY, P.; HÜTTER, R. & PLISKA, V. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.*, **173**: 85-91, 1988.
- HÖFTE, H.; DE GREVE, H.; SEURINCK, J.; JANSSENS, S.; MAHILLON, J.; AMPE, C.; VANDEKERCKHOVE, J.; VANDERBRUGGEN, H.; VAN MONTAGU, M.; ZABEAU, M. & VAECK, M. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur. J. Biochem.*, **161**: 273-280, 1986.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, **53** (2): 242-255, 1989.
- HONÉE, G.; CONVENTS, D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. & VISSER, B. The C-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. *Molecular Microbiology*, **5** (11): 2799-2806, 1991.
- HUBER, H. E.; LÜTHY, P.; EBERSOLD, H. R. & CORDIER, J. L. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. *Arch. Microbiol.* **129**: 14-18, 1981.
- INSTITUT PASTEUR, Guidelines for the isolation of spore-forming bacteria possessing vector control potential. Annexes 3-5, 5 th report of the scientific working group on Biological control of vectors (document TDR/VEC-SWG(5)/81-3).

- IZARD, D.; FERRAGUT, C.; GAVINI, F.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. & LECLERC, H. *Klebsiella terrigena*: a new species from soil and water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **31** (2): 116-127, 1981.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cell protein patterns. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, 115-129, 1985.
- JUTSUM, A. R. Comercial applications of biological control. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B*, **318**: 357-373, 1988.
- KALFON, A.; LUGTEN, M. & MARGALIT, J. Development of selective media for *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* var. *israelensis*. *Appl. Microbiol. Botechnol.*, **24**: 240-243, 1986.
- KANEDA, T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriology Reviews*, **41** (2):391-418, 1977.
- KANEKO, T.; NOZAKI, R. & AIZAWA, K. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Immunol.*, **22** (10): 639-641, 1978.
- KERSTERS, K.; HINZ, K. H.; HERTLE, A.; SEGERS, P.; LIEVENS, A.; SIEGMANN, O. & DE LEY, J. *Bordetella avium* sp. nov.; Isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **34** (1): 56-70, 1984.
- KHAWALED, K.; BEN-DOW, E.; ZARITSKY, A. & BARAK, Z. The fate of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *B. thuringiensis* var. *israelensis* - killed pupae of *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **56** (3): 312-316, 1990.
- KLIER, A.; FARGETTE, F.; RIBIER, J. & RAPAPORT, G. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain berliner 1715. *EMBO J.*, **1**: 791-799, 1982.
- KLIER, A.; LERECLUS, D.; RIBIER, J.; BOURGOUIN, C.; MENOU, G.; LECADET, M. -M.; & RAPAPORT, G. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the crystal protein gene from *Bacillus thurigiensis* strains *aizawa* 7-29 and comparison of the structural organization of genes from different seotypes. In: HOCH, J. A. & SETLOW, P. eds. *Molecular biology of microbial differentiation*. Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1985. p. 217-224.

- KNOWLES, B. H. & ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis as a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Biochimica et. Biophysica Acta* **924**, 509-578, 1987.
- KNOWLES, B. H. & ELLAR, D. J. Differential specificity of two insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. *Molecular Microbiology*, **2**: 153-157, 1988.
- KRIEG, A. A., HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A. & SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Journal of Applied Entomology*, **96**: 500-508, 1983.
- KRONSTAD, J. W., SCHNEPP, H. E. & WHITELEY, H. R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Journal of Bacteriology*, **154** (1): 419-428, 1983.
- KRONSTAD, J. W. & WHITELEY, H. R. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene*, **43**: 29-40, 1986.
- KRYCH, V. K.; JOHNSON, J. L. & YOUSTEN, A. A. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **30** (2): 476-484, 1980.
- LAMBERT, B.; HÖFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S.; SOETAERT, P. & PEFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against Coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (8): 2536-2542, 1992.
- LAURENT, P. & CHARLES, J. F. Action comparée des cristaux solubilisés des sérotypes H-14 et H-1 de *Bacillus thuringiensis* sur des cultures de cellules de *Aedes aegypti*. *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)*, **135A**: 473-484, 1984.
- LECADET, M. M.; CHAUFaux, J.; RIBIER, J. & LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(3): 840-849, 1992.
- LEE, H. L.; CHAN, S. T. & CHEONG, W. H. Laboratory bioassays of *Bacillus sphaericus* 1593, 2297 and 2362 against mosquitoes of public health importance in Malaysia. *Tropical Biomedicine* **3**: 161-165, 1986.
- LEE, H. L. Isolation and evaluation of two isolates of *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes of public health importance in Malaysia. *Mosquito-Borne Diseases Bulletin*, **5** (3-4): 39-47, 1988.

- LÖVGREN, A.; ZHANG, M.; ENGSTRÖM, A.; DALHAMMAR, G. & LANDÉN, R. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, **4** (12): 2137-2146, 1990.
- MANIATIS, T.; FRISCH, E. F. & SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p.328-387.
- MARGALIT, J. & DEAN, D. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **1** (1): 1- 7, 1985.
- MC GAUGHEY, W. H. & BEEMAN, R. W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: *Pyralidae*). *Journal of Economic Entomology* **81**: 28-33, 1988.
- MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRETT, P. & BURGESS, H. D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (4): 1344-1350, 1992.
- MIKKOLA, A. R.; CARLBERG, G. A.; VAARA, T. & GYLLENBERG, H. G. Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains. An electron microscope study. *FEMS Microbiol. Lett.*, **13**: 401-408, 1982.
- MURPHY, R. C. & STEVENS JR., E. Cloning and expression of the cryIVD gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (5): 1650-1655, 1992.
- MYERS, P. S. & YOUSTEN, A. A. Localization of a mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. *Applied and Environmental Microbiology*, **39** (6): 1205-1211, 1980.
- NORRIS, J. R. Sporeformers as insecticides. *J. Appl. Bact.*, **33**: 192-206, 1970.
- OBUKOWICZ, M. G.; PERLACK, F. J.; KUSANO-KRETZMER, K.; MEYWR, E. J. & WATRUD, L. S. Integration of the delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing strains of pseudomonads using Tn5. *Gene*, **45**: 327-331, 1986.
- O' DONNELL, A. G.; MAC FIE, H. J. H. & NORRIS, J. R. An investigation of the relationship between *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* using pyrolysis gas-liquid chromatography. *Journal of General Microbiology*, **119**: 189-194, 1980.
- OHBA, M. & AIZAWA, K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, **47** (1): 12-20, 1986.

- OHBA, M.; YU, Y. M. & AIZAWA, K. Non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* producing parasporal inclusions with unusual protein components. *Letters in Applied Microbiology*, 5: 29-32, 1987.
- OHBA, M. & AIZAWA, K. Occurrence of two pathotypes in *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Flagellar serotype 3a:3d:3e). *Journal of Invertebrate Pathology*, 55 (2): 293-294, 1990.
- ORDUZ, S.; ROJAS, W.; CORREA, M. M.; MONTAYA, A. E. & DE BARJAC, H. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 99-103, 1992.
- PANTUWATANA, S. & SATTABONGKOT, J. Comparison of development of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55 (2): 189-201, 1990.
- PREFONTAINE, G.; FAST, P.; LAU, P. C. K.; HEFFORD, M. A.; HANNA, Z. & BROUSSEAU, R. Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (12): 2808-2814, 1987.
- PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M. & TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 134: 1847-1882, 1988.
- PRIEST, F. G. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. In: HARWOOD, C. R. ed. *Biotechnology handbooks 2 Bacillus*, N. York, Plenum Press, 1989a, v.2, p. 27-56.
- PRIEST, F. G. Products and applications. In: HARWOOD, C. R. ed. *Biotechnology handbooks 2 Bacillus*, N. York, Plenum Press, 1989b, v.2, p. 293-320.
- PRIEST, F. G. & YOUSTEN, A. A. Entomopathogenic bacteria for biological control. Campinas, Brasil, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1991.
- PRIEST, F. G. A review - Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Biotechnology*, 72: 357-369, 1992.
- PUSZTAI, M.; FAST, P.; GRINGORTEN, L.; KAPLAN, H.; LESSARD, T. & CAREY, P. R. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.*, 243: 43-47, 1991.
- RATNER, M. DNA probes: the market versus the magic. *Bio/Technology*, 6: 1369-1370, 1988.

- RODRIGUES-PADILLA, C.; GALAN-WONG, L.; DE BARJAC, H.; ROMAN-CALDERON, E.; TAMEZ-GUERA, R. & DULMAGE, H. *Bacillus thuringiensis* subspecies *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *Journal of Invertebrate Pathology*, **56**: 280-282, 1990.
- ROSS, H. H.; ROSS, C. A. & ROSS, J. R. P. Insect pest and their control. In: *A textbook of entomology*. New York, John Wiley & Sons, 1982. p.631-666.
- ROWE, G. E. & MARGARITIS, A. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, **6**: 87-127, 1987.
- RUPAR, M. J.; DONOVAN, W. P.; GROAT, R. G.; SLANEY, A. C.; MATTISON, J. W.; JOHNSON, T. B.; CHARLES, J.-F.; DUMANOIR, V. C. & DE BARJAC, H. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 3337-3344, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 2^a ed., vol. 1.
- SCHENKEL, R. G. M.; NICOLAS, L.; FRACHON, E. & HAMON, S. Characterization and toxicity to mosquito larvae of four *Bacillus sphaericus* strains isolated from Brazilian soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, **60**: 10-14, 1992.
- SCHNEPF, H. E. & WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**: 2893-2897, 1981.
- SCHNEPF, H. E.; WONG, H. C. & WHITELEY, H. R. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, **260** (10): 6264-6272, 1985.
- SCHROEDER, J. M.; CHAMBERLAIN, C. & DAVIDSON, E. W. Resistance to the *Bacillus sphaericus* toxin in cultured mosquito cells. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, **25**: 887-891, 1989.
- SEKAR, V. & CARLTON, B. C. Molecular cloning of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Gene*, **33**: 151-158, 1985.
- SEKAR, V.; THOMPSON, D. V.; MARONEY, M. J.; BOOKLAND, R. G. & ADANG, M. J. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 7036-7040, 1987.

- SEKI, T.; CHUNG, C. K.; MIKAMI, H. & OSHIMA, Y. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **28**: 182-189, 1978.
- SHIBANO, Y.; YAMAGATA, A.; NAKAMURA, N.; IIZUKA, T.; SUGISAKI, H. & TAKANAMI, M. Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Gene*, **34**: 243-251, 1985.
- SICK, A.; GAERTNER, F. & WONG, A. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 1305, 1990.
- SINGER, S. *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. *Biotechnology and Bioengineering*, **XXII**: 1335-1355, 1980.
- SINGER, S. Clonal populations with special reference to *Bacillus sphaericus*. *Advances in Applied Microbiology*, **33**: 47-74, 1988.
- SMITH, R. A. Use of crystal serology to differentiate among varieties of *Bacillus thuringiensis*, **50**: 1-8, 1987.
- SMITH, R. A. & COUCHE, G. A. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (1): 311-315, 1991.
- SNEATH, P. H. A. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci In: SNEATH, P. H. A. *et al.* eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, editora Williams & Wilkins, 1986, 9^a ed., v. 2, Section 13, p. 1104-1105.
- SOMERVILLE, H. J. & JONES, M. L. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of Bacilli. *Journal of General Microbiology*, **73**: 257-265, 1972.
- STAHLY, D. P. & KLEIN, M. G. Problems with *in vitro* production of spores of *Bacillus popilliae* for use in biological control of the Japanese beetle. *Journal of Invertebrate Pathology*, **60** (3): 283-291, 1992.
- STONE, T. B., SIMS, S. R. & MARRONE, P. G. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology* **53**: 218-234, 1989.
- SUCEM, Superintendência de Controle de Endemias. Ofício Circular, DCV n° 51/90, 31.07.90a.
- SUCEM, Superintendência de Controle de Edemias. Brasil: Exames laboratoriais para malária no 1° semestre de 1990 (Análise comparativa com idêntico período de 1989). Ofício Circular DCV n° 78/90, 15.10.90b.

- TABASHNIK, B. E.; CUSHING, N. L.; FINSON, N. & JOHNSON, M. W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: *Plutellidae*). *Journal of Economic Entomology*, **83** (5): 1671-1676, 1990.
- TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (10): 3343-3346, 1992.
- TASHIRO, H. & WHITE, R. T. Milky diseases of European chafer larvae. *Journal Econ. Ent.* **47**: 1087-1092, 1954.
- THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* **60**: 181-197, 1983.
- THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A. M. & POLLOCK, T. J. Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". *Journal of Bacteriology*, **166** (3): 801-811, 1986.
- TYRELL, D. J.; BULLA JR.; L. A.; ANDREWS, R. E.; KRAMER, K. J.; DAVIDSON, L. I. & NORDIN, P. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystal of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Bacteriology*, **145**: 1052-1062, 1981.
- VAECK, M., REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M. & LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* (London) **328**: 33-37, 1987.
- VANDEKAR, M. & DULMAGE, H. T. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Special programme for research and training in tropical disease. Geneva, Suíca, 1982.
- VISSER, B.; VAN DER DALM, T.; VAN DER BRINK, W. & FOLKERS, G. Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 60.5 coding for insect-specific proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **212**: 219-224, 1988.
- VON ALLMEN, S. D.; LÓPEZ-CORREA, R. H.; WOODALL, J. P.; MORENS, D. M.; CHIRIBOGA, J. & CASTA-VELEZ, A. Epidemic dengue fever in Puerto Rico, 1977: A cost analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**(6): 1040-1044, 1979.
- VON TERSCH, M. A.; ROBBINS, H. L.; JANY, C. S. & JOHNSON, T. B. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c) toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (2): 349-358, 1991.

- ZAHNER, V.; MOMEN, H.; SALLES, C. A. & RABINOVITCH, L. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Bacteriology*, **67**: 275-282, 1989.
- WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH, S. Y.; HORZINEK, M. C.; IGARISHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D. K.; PORTERFIELD, J. S.; RUSSELL, P. K. & TRENT, D. W. *Flaviviridae*. *Intervirology*, **24**: 183-192, 1985
- WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E.; KRONSTAD, J. W. & WONG, H. C. Structural and regulatory analysis of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. In: HOCH, J. A. & SETLOW, P. ed. *Genetics and biotechnology of bacilli*. New York, Academic Press, Inc. 1984, p. 375-386.
- YAMAMOTO, T.; IIZUKA, T. & ARONSON, J. N. Mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: identification and partial isolation of protein. *Curr. Microbiol.*, **9**: 279-284, 1983.
- YOUSTEN, A. A. Bacteriophage typing of mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **43** (1): 124-125, 1984.