

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jeane Quintanilha Chaves

Análises Fenotípicas e Genotípicas de Estirpes Autoaglutinantes de

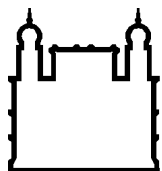
Bacillus thuringiensis

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Bacteriologia

Orientadores (es): Prof. Dr. Leon Rabinovitch

Prof. Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados

**RIO DE JANEIRO
2004**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Jeane Quintanilha Chaves

**Análises Fenotípicas e Genotípicas de Estirpes Autoaglutinantes de
*Bacillus thuringiensis***

Orientadores (es): Prof. Dr. Leon Rabinovitch

Prof. Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados

Aprovada em: 23 / 11 / 2004

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Claude André Solari

Prof. Dra. Lídia Mariana Fiúza

Prof. Dra. Lucy Seldin

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2004

Aos meus pais, Albertina Quintanilha Chaves e José Ribamar Chaves pelo carinho e dedicação e à minha querida irmã Luciane pelo incentivo e atitudes sempre carinhosas.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Leon Rabinovitch e Clara de Fátima Gomes Cavados, pelas condições de trabalhos oferecidas, pela orientação e apoio, pelos ensinamentos constantes, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho e principalmente pela amizade.

À Paula Roberta Brandão da Silva, bolsista do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, pela ajuda inestimável nos ensaios biológicos, pelo carinho e amizade.

À Sonia Ermelinda Alves da Silva, pelo carinho, amizade e valiosos empréstimos de livros e separatas que foram indispensáveis para elaboração desta dissertação.

Ao André Felipe das Mercês Santos, por sua amizade e colaboração na edição gráfica das fotos dos géis contidas no texto.

Ao Edmar Justo de Oliveira, por sua amizade e auxílio na confecção gráfica desta dissertação.

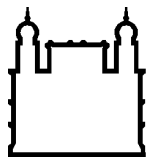
Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, Aline Fonseca, Cristina Maria, Rosângela Costa, Thiago Vieira e aos que aqui já estiveram trabalhando conosco, Cláudia Maroja, Regina Santos, Sayonara Azevedo, pela colaboração, incentivo e amizade.

Ao Dr. José Bento Pereira Lima, do Setor de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército, pela grata colaboração fornecendo larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, utilizadas para efetuar os bioensaios qualitativos neste estudo.

Ao Lydston Rodrigues Carvalho, pela presteza no fornecimento de protocolos importantes para a realização experimental deste trabalho.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz pela atenção dispensada.

A todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

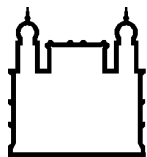
Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jeane Quintanilha Chaves

Vinte e oito estirpes de *Bacillus thuringiensis* autoaglutinantes foram estudadas, mediante o emprego de métodos fenotípicos e genotípicos, com o objetivo de se avaliar a similaridade e a homogeneidade intra-específica entre essas estirpes, isoladas de diferentes nichos ecológicos e distintos locais. Na avaliação da atividade biológica qualitativa foram efetuados bioensaios preliminares contra duas espécies de mosquitos-vetores: *Aedes aegypti* (vetor do Dengue e Febre Amarela) e *Culex quinquefasciatus* (vetor da Filariose Bancroftiana). Os resultados da atividade larvicida mostram que 26 estirpes foram patogênicas aos mosquitos-vetores (mortalidade larval > 50%) e duas estirpes apresentaram baixa toxicidade (mortalidade larval entre 0% e 20%). Quanto aos caracteres fenotípicos, as estirpes demonstraram, em sua maioria, os mesmos parâmetros característicos para a espécie em estudo. No perfil de resistência, as estirpes revelaram múltipla resistência a antimicrobianos, destacando-se que as 28 estirpes apresentaram 100% de resistência a seis antimicrobianos (Bacitracina, Lincomicina, Penicilina G, Polimixina G, Rifampicina, Vancomicina) e somente dois, Netilmicina e Sulfametoxazol/Trimetoprim, demonstraram 100% de inibição para as estirpes estudadas. A análise das proteínas dos cristais de protoxinas revelaram cinco grupos com perfis protéicos distintos. O principal grupo incluem-se 23 estirpes mosquitocidas, as quais apresentaram o mesmo perfil protéico do sorovar *israelensis*. Através da eletroforese de isoenzimas, foi observada a presença de três tipos eletroforéticos (TEs). Todas as estirpes mosquitocidas agruparam-se em um único TE. O polimorfismo do DNA, obtido com amplificação do RAPD-PCR, formou para cada um dos seis iniciadores, três diferentes perfis de RAPD para as 28 estirpes autoaglutinantes, possibilitando, desta forma, correlacionar os perfis obtidos com a toxicidade verificada nos bioensaios qualitativos. Todos os amplicons produzidos pelas estirpes autoaglutinantes mosquitocidas, para cada um dos seis iniciadores utilizados, apresentaram-se idênticos ao amplicon produzido pelo sorovar *israelensis*. Para as estirpes atóxicas, cada iniciador reproduziu amplicons distintos, o que demonstra tratar-se provavelmente de sorovares diferentes. Por fim, mesmo não sendo identificada pela sorologia flagelar clássica, as 26 estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* apresentaram na análise isoenzimática e no perfil de RAPD, características compatíveis com aquelas conhecidas em *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jeane Quintanilha Chaves

Twenty eight “autoagglutinating” strains of *Bacillus thuringiensis* were studied by using through phenotypic and genotypic methods, aiming to evaluated the intra-specific similarity and homogeneity between them. Strains were isolated from different ecologic niches and distinct sites and could not be serologically typed. Biological activity was evaluated through bioassays against two species of mosquitoes: *Aedes aegypti* (vector of Dengue and Yellow Fever) and *Culex quinquefasciatus* (vector of Bancroftian Filariasis). The results of the larvicidal activity demonstrated that 26 “autoagglutinating” strains were toxic to mosquitoes-vectors (mortality > 50%) and two strains presented low toxicity (mortality among 0% to 20%). The phenotypic characters of these bacterial strains demonstrated in their majority the same peculiar properties for the species under study. The resistance profiles of strains revealed multiple resistance to antimicrobials, being all these 28 “autoagglutinating” strains 100% resistant to six antimicrobials Bacitracin, Lincomycin, Polymyxin B, Penicillin G, Rifampicin, Vancomycin and only two Netilmicin and Sulphamethoxazole/Trimethoprim, showed 100% of inhibition. The protein profiles of crystals components revealed four classes with distinctive protein patterns. The main class includes 23 mosquitocidal strains, which demonstrated the same protein profile of the serovar *israelensis*. Using isoenzyme analysis (MLEE), it was observed the presence of three electrophoretic types (ETs). The mosquitocidal strains grouped into one ET. The random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) was evaluated using six primers, which demonstrated three different patterns for the 28 “autoagglutinating” strains, allowing to correlate the profiles obtained with the toxicity observed in the bioassays. The RAPD patterns established by mosquitocidal strains, demonstrated to be identical to the one of serovar *israelensis*. However, to strains of low toxicity, each primer established distinctive RAPD patterns, which demonstrated that these strains belongs to different serovars. Although the flagellar serotyping has not been identified the 26 “autoagglutinating” strains of *Bacillus thuringiensis*, MLEE and RAPD profiles were compatible to that of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Índice de Quadros

	Páginas
Quadro 1: Parâmetros para interpretação dos diâmetros dos halos de inibição nos antibiogramas.	55
Quadro 2: Soluções tampões empregadas na técnica de eletroforese de isoenzimas (MLEE).	59
Quadro 3: Sistemas de revelação das enzimas empregados na técnica da eletroforese de isoenzimas (MLEE).	61
Quadro 4: Seqüências dos iniciadores utilizados na técnica de amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR).	64

Índice de Figuras

	Páginas
Figura 1: Micrografia eletrônica do esporângio de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i> , revelando o esporo (spore) e a inclusão paraesporal (crystal). A barra equivale a 0,5µm. (Reproduzido de Regis et al, 2001).	6
Figura 2: Posições dos blocos conservados entre as diferentes classes de δ -endotoxinas. A seqüência dos blocos são mostrados em cinza escuro, cinza claro ou branco para indicar alto, moderado ou baixo grau de homologia, respectivamente, na seqüência consenso de cada bloco conservado. (Reproduzido de Schnepf et al, 1998).	11
Figura 3: Estrutura tridimensional das proteínas Cry1A, Cry3A e Cyt2A. (Reproduzido de Schnepf et al, 1998).	12
Figura 4: Representação da estrutura tridimensional da toxina Cry11Bb. A: Diagrama em fita da δ -endotoxina Cry11Bb, mostrando a organização dos domínios. B: Os três domínios são: I, um feixe de 9 α -hélices e duas fitas β curtas (fúcsia); II, reunião de três folhas β (base); III, um β -sanduíche (parte superior direita). (Reproduzido de Gutierrez et al, 2001).	13
Figura 5: Comparação dos domínios estruturais das proteínas Cry1Aa, Cry11Bb e Cry3A. No plano superior, o domínio I mostra que as três toxinas são quase idênticas. No plano interno do domínio II, as diferenças entre as três toxinas estão localizadas, especificamente, nas alças internas da figura. No plano inferior o domínio III não demonstra diferenças, exceto nas alças β 16- β 17, localizada no meio da figura. (Reproduzido de Gutierrez et al, 2001).	14
Figura 6: Representação esquemática do modelo “guarda-chuva”, proposto para representar as interações da δ -endotoxina Cry3A com membranas fosfolipídicas, mostrando a inserção das hélices α 4 e α 5 na membrana, como um grampo helicoidal. As hélices estão coloridas de acordo com a seqüência do arco-íris.(Reproduzido de Gazit et al,1998).	15
Figura 7: Representação esquemática do modelo “canivete”, proposto para representar as interações da δ -endotoxina Cry3A com membranas fosfolipídicas, mostrando a inserção das hélices α 5 e α 6 na membrana, como um grampo helicoidal. O receptor é indicado pela letra R. (Reproduzido de Knowles, 1994).	16

- Figura 8:** Modelo da interação da δ -endotoxina com a membrana lipídica. **(a)** Esquema da estrutura tridimensional da proteína Cry3A com as três α -hélices da porção N-terminal afastadas da estrutura. Os domínios I, II e III são mostrados em vermelho, verde e azul, respectivamente. **(b)** A superfície molecular das toxinas sem as hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$. As regiões hidrofóbicas da superfície são mostradas em verde. As projeções da três α -hélices omitidas são mostradas como cilindros. **(c)** Representação esquemática da interação da δ -endotoxina com a membrana lipídica. As hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$ na estrutura da δ -endotoxina não são mostrados. (Reproduzido de Loseva et al, 2001). 18
- Figura 9:** Estrutura global do monômero Cyt2A. Diagrama em fita, mostrando que as camadas helicoidais são feitas de dobras em grampo e que uma fita na folha β é composta por dois fragmentos não contíguos ($\beta 2$ e $\beta 4$), com sentidos opostos. O declive colorido (vermelho na região N-terminal ao magenta na fração C-terminal segue a ordem do arco-íris) mostra que, na seqüência peptídica, o par de hélices A-B precede o par de hélices C-D, o qual, precede as fitas internas da folha. No espaço entre $\beta 1$ e $\beta 2$, insere-se a equivalente fita $\beta 1$ de outro monômero, para formar uma folha dimérica. (Reproduzido de Li et al, 1996). 22
- Figura 10:** A representação esquemática do modo de interação na membrana pela toxina Cry4A. Existem duas vias paralela distinta, conduzindo a ligação irreversível na superfície da célula-alvo. **(A)** Associação direta e não-específica da toxina Cry4A, com a superfície da membrana. **(B)** Ligação inicial reversível da toxina ativada com receptores específicos, e em seguida, a inserção da toxina na membrana, induzindo a formação do canal funcional. (Reproduzido de Yamagiwa et al, 2001). 27
- Figura 11:** Os dois modelos hipotéticos do modo de ação da proteína Cyt1A. **(1)** A toxina solúvel difunde na fase extracelular. **(2)** Durante a passagem pela membrana, as toxinas modificam a conformação estrutural e ligam-se aos lipídeos. **(3)** As toxinas ou inserem-se na bicamada lipídica, onde formam poros oligoméricos, ou permanecem (possivelmente agregadas) dispersas na superfície da membrana, onde encontram-se fragmentados dentro do complexo lipídeo/toxina. As moléculas intracelulares (círculos pretos) fluem ou através dos poros ou através das falhas na bicamada lipídica. (Reproduzido de Butko, 2003). 31
- Figura 12:** Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise de resistência aos antimicrobianos de estipes de *Bacillus thuringiensis* autoaglutinantes. 73

Figura 13:	Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise de sensibilidade aos antimicrobianos de estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> autoaglutinantes.	74
Figura 14:	Perfil protéico de cristais de protoxinas das <i>Bacillus thuringiensis</i> autoaglutinantes mosquitocidas.	76
Figura 15:	Perfil protéico das δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> autoaglutinantes.	77
Figura 16:	Perfil protéico das δ -endotoxinas das estirpes autoaglutinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> atóxicas.	78
Figura 17:	Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise isoenzimática das estirpes autoaglutinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	81
Figura 18:	Perfil da amplificação aleatória de DNAs polimórficos das estirpes autoaglutinantes de <i>B. thuringiensis</i> gerado pelo o iniciador número 1.	83
Figura 19:	Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise do RAPD-PCR amplificado pelo o iniciador número 1 das estirpes autoaglutinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	84

Índice de Tabelas

	Páginas
Tabela 1: Fontes e locais de isolamento das linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas neste estudo	45
Tabela 2: Resultados da citomorfologia e avaliação qualitativa da atividade biológica das estirpes autoaglutinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	67
Tabela 3: Resultados de provas bioquímicas e fisiológicas das estirpes autoaglutinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	68
Tabela 4: Perfil de resistência e sensibilidade das estirpes autoaglutinantes, bem como, a respectiva porcentagem de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	71
Tabela 5: Perfil dos eletromorfos das estirpes autoaglutinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	79
Tabela 6: Resultados dos fragmentos obtidos por cada iniciador na análise do RAPD-PCR.	86

SUMÁRIO

	Páginas
1-INTRODUÇÃO	1
1.1 - O Gênero <i>Bacillus</i> e Espécies Entomopatogênicas	1
1.2 - <i>Bacillus thuringiensis</i> e a Sorologia Flagelar	3
1.3 - Características Gerais do <i>B. thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	6
1.4 - A Estrutura das Toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	9
1.5 - Mecanismo de Ação das Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
1.6 - Efeitos das Interações Sinérgicas na Potência das Toxinas de <i>B. thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i>	32
1.7 - Resistência dos Insetos as Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
1.8 - A Genética e a Biologia Molecular de <i>B. thuringiensis</i>	35
1.9 - Caracterização Molecular de δ -endotoxinas	39
2 – OBJETIVOS	44
2.1 – Gerais	44
2.2 – Específicos	44
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 – Cepas Bacterianas Empregadas e Suas Procedências	45
3.2 – Confirmação da Posição Taxonômica das Cepas Bacterianas	46
3.2.1 – Identificação Morfológica	47
3.2.1.1 – Método de Coloração de Gram	47
3.2.1.2 – Dimensionamento das Células na Fase Vegetativa de Crescimento	47
3.2.1.3 – Evidenciação do Esporo e do Corpo Para-esporal	47

3.3 – Provas Bioquímicas e Fisiológicas	47
3.3.1 – Crescimento Anaeróbico	47
3.3.2 – Hidrólise do Amido	48
3.3.3 – Fermentação de Carboidratos	48
3.3.4 – Hidrólise da Caseína	49
3.3.5 – Utilização do Citrato de Sódio	49
3.3.6 – Hidrólise da Esculina	50
3.3.7 – Redução do Nitrato a Nitrito	50
3.3.8 – Produção de Acetil-Metil-Carbinol	51
3.3.9 – Produção da Lecitinase	51
3.3.10 – Produção de Catalase	52
3.3.11 – Liquefação da Gelatina	52
3.3.12 – Ágar-Sangue com Produção de Hemólise	52
3.3.13 – Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio	53
3.3.14 – Produção do Indol	53
3.3.15 – Caldo Nutriente	53
3.3.16 – Ágar Nutriente	53
3.4 – Avaliação Qualitativa da Atividade Biológica	54
3.5 – Susceptibilidade a Antimicrobianos	54
3.5.1 – Inoculação das Placas de Petri	55
3.5.2 – Interpretações dos Resultados	55
3.6 – Eletroforese de Proteínas dos Cristais de Protoxinas	56
3.7 – Eletroforese de Multilocus Enzimáticos (MLEE)	57

3.7.1 – Procedimento Experimental	58
3.7.1.1 – Crescimento e Lise Celular	58
3.7.1.2 – Técnica de Eletroforese de Isoenzimas (Eletroforese de Multilocus Enzimáticos – MLEE)	58
3.7.1.3 – Revelação das Isoenzimas	59
3.7.1.4 – Interpretação dos Géis	60
3.8 – Estudos Genéticos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	62
3.8.1 – Extração de DNA	62
3.8.2 - Dosagem do DNA	63
3.8.3 - Condições de Amplificação para Análise do RAPD-PCR	63
3.8.4 - Oligonucleotídeos Iniciadores	64
3.8.5 – Condições de Eletroforese para os Produtos Amplificados por RAPD-PCR	64
3.9 – Análise Numérica	65
4 – RESULTADOS	66
4.1 – Avaliação Qualitativa da Atividade Biológica, Citomorfologia, Fisiologia e Bioquímica	66
4.2 – Susceptibilidade a Antimicrobianos	70
4.3 – Caracterização Protéica dos Cristais de Protoxinas	75
4.4 – Eletroforese de Multilocus Enzimáticos (MLEE)	79
4.5 – Amplificação Aleatória de DNAs Polimórficos (RAPD-PCR)	82
5 – DISCUSSÃO	85
6 – CONCLUSÕES	93
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – O Gênero *Bacillus* e Espécies Entomopatogênicas

Os *Bacillus* formam um extenso grupo taxonômico bacteriano, e têm variadas características fisiológicas, bioquímicas, citológicas e genéticas. Este gênero, que pertence à Família *Bacillaceae*, tem células em forma de bastões retos ou quase, isolados, aos pares ou formando cadeias. Têm a capacidade de produzir endósporos e daí esporos livres termo-resistentes. A forma do endósporo e o aspecto da célula-mãe produtora do esporo, o esporângio, são características próprias do Gênero *Bacillus*. Estes esporos são usualmente cilíndricos, elípticos, ovais ou ainda redondos, sendo que, durante a formação do endósporo, o esporângio pode ou não se deformar. A localização do esporo pode ser central, subterminal e terminal, ou ainda em posição lateral dentro do esporângio (Gordon et al, 1973; Claus & Berkeley, 1986).

As bactérias deste gênero são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, estando esta última propriedade dependente de condições de cultivo e nutrientes. O metabolismo é estritamente respiratório, estritamente fermentativo ou ambos, usando vários substratos. O oxigênio é o aceptor terminal de elétrons, substituível em algumas espécies por vias respiratórias alternativas. São quimiorganotróficos, raramente quimiolitotróficos. Coram-se pelo cristal de violeta do método de Gram, entretanto existem espécies que fixam o cristal de violeta somente em culturas jovens, tornando-se depois células Gram-lábeis ou Gram-negativas. O peptidoglicano da parede celular, da maioria das espécies do gênero, é do tipo que possui ligações cruzadas de ácido diaminopimélico. As células vegetativas possuem flagelos em geral peritríquios, os quais como antígenos têm importância auxiliar na taxonomia, por favorecer o estabelecimento de sorotipos e sorovares dentro das espécies (Gordon et al, 1973; Claus & Berkeley, 1986).

O número de espécies tem aumentado razoavelmente nos últimos anos passando das 65 espécies citadas no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) para cerca de 114, muito embora algumas espécies de *Bacillus*, como *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. larvae*, *B. alvei* e *B. macerans* tenham sido transferidas para novos gêneros como *Paenibacillus* (*P. polymyxa*, *P. popilliae*, *P. larvae*) e *Brevibacillus* (*B. brevis* e *B. laterosporus*). Estas reclassificações foram

baseadas sobretudo em análises comparativas da sequência do RNA ribossomal 16S (Ash et al, 1991, Ash et al, 1993 e Shida et al, 1996).

A maioria das espécies formadoras de endósporos aeróbios, aparentemente, possui pouco ou nenhum potencial patogênico e estão raramente associadas com enfermidades em humanos e outros animais. As principais exceções incluem o *B. anthracis*, o agente do antraz, e o *B. cereus*, que pode crescer em alimentos e produzir enterotoxinas capazes de causar doenças de origem alimentar; além das espécies citadas, particularmente o *B. licheniformis* também vem sendo associado com intoxicação alimentar e outras infecções em animais e no homem. A resistência dos esporos ao calor, radiação, desinfetantes e dessecação resulta em formas resistentes que contaminam salas de cirurgias, jalecos cirúrgicos, produtos farmacêuticos e alimentos estocados (Logan & Turnbull, 2003).

Inúmeras espécies deste gênero e de correlatos possuem importância médica e clínica, com uma ampla variedade de possibilidades: na produção de antibióticos (particularmente a bacitracina do *B. licheniformis* e a polimixina do *P. polymyxa*) ou vitaminas (como vitamina B12 e B2 do *B. megaterium* e biotina e riboflavina do *B. subtilis*); como base para testes de antibióticos (*B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e *Geobacillus stearothermophilus*); na validação de desinfetantes (*B. cereus*) e no monitoramento de fumigação (*B. subtilis*); nos processos de esterilização (*G. stearothermophilus*) e de radiação (*B. pumilus*); e em diversos exames clínicos (como teste para ácido úrico utilizando o *B. fastidiosus*, um teste para detecção de *Chlamydia* utilizando uma variante da subtilisina do *B. subtilis* e um teste para triagem de sangue para fenilcetonúria utilizando também o *B. subtilis*). As endonucleases de restrição e DNA polimerases de várias espécies de *Bacillus* são consideradas importantes ferramentas de pesquisa para melhor esclarecimento de doenças e no aprimoramento de diagnósticos (Logan & Turnbull, 2003).

Também integram o grupo de *Bacillus* várias espécies entomopatogênicas, as quais por sintetizarem protoxinas de natureza glicoprotéica (corpos paraesporais) ou protoxinas cristalinas, são capazes de causar intoxicação e eliminar considerável número de insetos. Sabe-se que a espécie *B. thuringiensis* é capaz de produzir intoxicação e, ou, septicemia em Diptera, Coleoptera e Lepidoptera, e que muitas estirpes, isoladas recentemente, têm exibido atividade contra Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, Mallophaga e Isoptera (Fortes-Castilhos et al, 2002; Pinto

et al, 2003), assim como contra nematóides, ácaros e protozoários (Iudina, 1996; Schnepf et al, 1998). As delta-endotoxinas, como corpos sólidos cristalinos imersos no citoplasma, situam-se adjacentes aos esporos e são de longa data também conhecidos pela denominação de corpos paraesporais. Esses corpos são estruturas com massas moleculares que variam de 25kDa até 140kDa sintetizados durante a esporogênese, e quando observados sob microscopia de contraste-de-fase (1.000 aumentos ou mais) exibem as formas mais variadas. Assim, numa investigação sobre 2.793 cepas da espécie *B. thuringiensis* isoladas de diferentes regiões geográficas do planeta, 45,9% das delta-endotoxinas eram do tipo bi-piramidal, 14,2% esféricas, 4,4% retangulares ou cubóides, 16,4% irregularmente esféricas e 19,1% do tipo puntiforme-irregulares (Bernhard et al, 1997).

Duas estirpes destacam-se como princípios tóxicos de inseticidas larvicidas de mosquitos, o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* H 14 e o *B. sphaericus* H 5a, 5b (cepa 2362). A primeira atua contra várias espécies de dípteros das Famílias Culicidae e Simuliidae, enquanto que a segunda possui espectro mais limitado, sendo muito ativa contra espécies de *Culex* e *Anopheles* (Weiser, 1984; Margalit & Dean, 1985).

Atualmente, mais de 120 diferentes genes de cristais de δ -endotoxinas já foram seqüenciados, sendo alguns também clonados em bactérias ou em plantas (Schuler et al, 1998; Hilder & Boulter, 1999; Wirth et al, 2000). Estes genes foram grupados em 46 classes variando de *cry* 1 a *cry* 46 e codificam proteínas cujas atividades patogênicas acometem insetos das ordens anteriormente citadas (Gill et al, 1992; Crickmore, 2000).

1.2 – *Bacillus thuringiensis* e a Sorologia Flagelar

Muitas espécies do Gênero *Bacillus* são dotadas de flagelos peritríquios que conferem mobilidade à célula (Claus & Berkeley, 1986). Os flagelos constituem-se de componentes protéicos fortemente imunogênicos. São estruturas constituídas principalmente de proteínas conhecidas por flagelinas e também antígenos-H, os quais permitem a obtenção de anticorpos específicos.

A introdução de sorotipos baseados no antígeno flagelar, ou seja, no antígeno-H, além de parâmetros bioquímicos mais precisos, facilitou a diferenciação entre os vários novos isolados de *B. thuringiensis* (De Barjac & Bonnefoi, 1962). Logo, a proposta dos referidos autores, para classificação de *B. thuringiensis*, apoiou-se em uma base dupla, nos critérios bioquímicos e sorológicos.

Além disso, os antígenos-H são estáveis, seguros e específicos como foi visto para *B. thuringiensis* (De Barjac & Frachon, 1990). Os anticorpos obtidos em anti-soros de animais, como o coelho, permitem realizar reações de aglutinação *in vitro* que revelam frações intra-específicas. Assim, facilitam a chamada classificação sorológica com base no conhecimento dos sorotipos. Deste modo, os sorovares de *B. thuringiensis* foram discriminados de acordo com as características antigênicas dos flagelos (De Barjac & Frachon, 1990).

Bonnefoi e De Barjac (1963) determinaram várias características culturais e bioquímicas de 50 cepas de *B. thuringiensis* e, com o método de análise sorológica do antígeno-H, foram capazes de identificar e agrupar as mesmas em nove sorotipos distintos. Norris e Burges (1963) e Norris (1964), através de análise eletroforética das formas moleculares da enzima esterase, estabeleceram nove padrões, que correspondem aos grupos sorológicos obtidos por Bonnefoi e De Barjac (1963), com pequenas exceções. Os sorovares *sotto* e *dendrolimus*, por exemplo, são sorologicamente idênticos, porém mostraram-se distintos quando submetidos à análise da enzima esterase. Deste modo, Norris e Burges (1963) recomendaram o uso dessa análise em estudos taxonômicos de linhagens de *B. thuringiensis*.

Até 1981, já eram estabelecidos 15 sorotipos, abrangendo 22 sorovares desse bacilo (De Barjac, 1981). A descoberta de subfatores antigênicos em cinco desses sorotipos – H 3 (De Barjac & Lemille, 1970), H 4 (Bonnefoi & De Barjac, 1963), H 5 (De Barjac & Bonnefoi, 1962), H 8 (Habib, 1982) e H 11 (Ohba & Aizawa, 1978) – resultou na divisão de cada um em dois subtipos. Com as técnicas mencionadas, havia até 1982 um total de 19 sorotipos, sendo que 5 apresentaram subtipos (Habib, 1982). Na revisão de 1990, De Barjac e Frachon, identificaram 34 sorovares, incluindo 27 grupos antigênicos e 7 subtipos.

Lecadet et al (1996) relacionaram 55 antígenos-H e 68 sorovares entre os *B. thuringiensis* isolados de praticamente todas as regiões da terra, demonstrando o acentuado interesse nas propriedades entomopatogênicas desta bactéria.

Os estudos sobre esse patógeno indicam que as diferenças bioquímicas e sorológicas entre os diferentes sorotipos estão diretamente relacionados com outras características, como especificidade e toxicidade, a qual é essencialmente definida pelas δ -endotoxinas que constituem o cristal protéico (Ohba & Aizawa, 1978). Os freqüentes isolamentos de novas linhagens a partir de diferentes hospedeiros e fontes, revelam a ampla distribuição natural da bactéria, podendo ser considerada como cosmopolita (De Barjac & Bonnefoi, 1968; Krywienczyk & Fast, 1980).

Lecadet et al (1999) atualizaram a classificação do antígeno flagelar das linhagens da espécie *B. thuringiensis* e relacionaram 69 sorotipos com 13 grupos sub-antigênicos que perfazem 82 sorovares, entre os 3.500 isolados da espécie pertencentes à Coleção do Centro Internacional de Bactérias Entomopatogênicas (IEBC) do Instituto Pasteur - França.

Nesta atualização, os autores avaliaram os critérios bioquímicos e seu valor na identificação de *B. thuringiensis* em nível de sorovar. Uma análise do cristal protéico foi efetuada em termos de morfologia, perfil das δ -endotoxinas e atividade larvicida para os sorovares recentemente identificados. Os resultados demonstraram que os cristais protéicos atípicos, com novas proteínas, estavam tornando-se comuns, principalmente para os sorovares descritos nos últimos 10 anos, para os quais nenhum inseto-alvo havia sido identificado (Juarez-Perez et al, 1994; Burtsera et al, 1995; Rabinovitch et al, 1995; Chaufaux et al, 1997). Essa diversidade de linhagens demonstra o alto grau de variabilidade genética apresentado pela espécie.

No entanto, o método de sorotipagem, como foi definido e empregado, apresenta uma situação ambígua. Segundo Lecadet et al (1999), é cada vez maior o número de informações sobre o isolamento de *B. thuringiensis* autoaglutinantes, contra os quais não se consegue identificar os sorotipos com base nos procedimentos da sorologia flagelar tradicional. As estirpes autoaglutinantes compõem quase 3% dos *B. thuringiensis* presente na coleção do IEBC.

As suspensões bacterianas das estirpes autoaglutinantes, quando submetidas aos testes de sorotipagem, aglutinam espontaneamente na ausência do anti-soro específico sob condições experimentais, tornando-se impossível à caracterização antigênica. Por razões distintas, algumas estirpes de *B. thuringiensis*, ditas cepas não-móveis, também escapam da sorotipagem (Lecadet et al, 1999).

De acordo com Hansen et al (1998), as técnicas moleculares como hibridização colonial e amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR), são informativas, particularmente com respeito à avaliação de um número elevado de cepas a serem analisadas. Com o aumento constante do número de cepas de *B. thuringiensis* isoladas por vários centros de pesquisa, tais métodos moleculares serão necessários para ajudar a agrupar novas estirpes e auxiliar na sua classificação, principalmente, para as quais não foi possível a sorotipagem pelo antígeno flagelar. Atualmente, existem 91 sorovares desta bactéria relacionadas no NCBI (2004) provenientes de todos os continentes.

1.3 – Características Gerais do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*

A primeira cepa mosquitocida de *B. thuringiensis* foi isolada em 1976 de larvas moribundas de *Culex pipens*, a partir de solo de um lago estagnado situado no Deserto de Negev, em Israel (Goldberg & Margalit, 1977; Margalit & Dean, 1985), identificada como o 14^o antígeno flagelar, H 14 (De Barjac, 1978) e denominada sorovar *israelensis* (Figura 1).

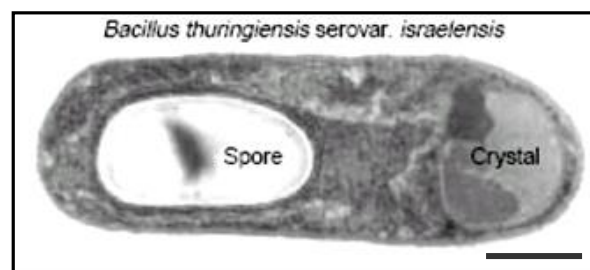


Figura 1: Micrografia eletrônica do esporângio de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, revelando o esporo (Spore) e a inclusão para-esporal (Crystal). A barra equivale a 0,5µm. (Reproduzido de Regis et al, 2001).

São bactérias Gram-positivas, esporuladas, aeróbias facultativas, quimioheterotróficas, cuja temperatura ideal de crescimento é de 30°C. Suas células vegetativas possuem a forma de bastonete e, quando em condições específicas, em geral desfavoráveis, desenvolvem um ciclo de esporulação típico dos bacilos, com esporos de formato predominantemente cilíndrico, podendo ser elípticos em menor proporção, localizam-se na região central ou subterminal da célula. As dimensões das células são de 1,0 a 1,2 µm de largura, e 3,0 a 5,0 µm de comprimento, são geralmente móveis, em função de flagelos peritríquios que correspondem ao sorotipo H 14 (De Barjac & Frachon, 1990). Em geral, decompõem a tirosina, hidrolisam o amido, caseína, gelatina, aesculina e lecitinase. Reduzem o nitrato a nitrito e utilizam o citrato como fonte de carbono. No crescimento vegetativo, produzem acetoina e não produzem gás quando na presença de glicose (Gordon et al, 1973; Claus & Berkeley, 1986).

O *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* produz inclusões paraesporais cristalinas protéicas, que conferem a essa bactéria a sua propriedade entomopatogênica. Esses cristais de proteínas, sintetizados durante os estágios III a V da fase de esporulação, são formados por polipeptídeos denominados δ -endotoxinas (proteínas Cry), que vão sendo acumulados na célula-mãe durante o ciclo vegetativo. No final da esporulação, o cristal corresponde de 20% a 30% do peso seco da célula esporulada, sendo liberado juntamente com o esporo, no momento da lise celular (Schnepf et al, 1998).

Estas inclusões cristalinas têm se mostrado especialmente tóxicas para a maioria das larvas de dípteros da subordem Nematocera, incluindo mosquitos (Culicidae) (Goldberg & Margalit, 1977) e borrachudos (Simuliidae) (Undeen & Nagel, 1978; Federici, 1995) e famílias próximas desta subordem, tais como, certos chironomídeos (Rodcharoen et al, 1991), tipulídeos (Waalwijk et al, 1992) e algumas espécies de blefarocerídeos (Molloy, 1992; Wipfli et al, 1994).

Entre os culicídeos conhecidos como susceptíveis, incluem-se em ordem decrescente de susceptibilidade, os Gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, em cujas espécies se encontram importantes vetores de agentes patogênicos de endemias tropicais, tais como o dengue, filariose bancroftiana, malária, febre amarela, dentre outras (Ruas Neto & Oliveira, 1985; Priest, 1992).

A atividade inseticida do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* resulta da ação de quatro polipeptídeos principais, com massas moleculares de 135, 125, 68 e 28 kDa, representando 5%,

5%, 35% e 54% do total de proteínas do cristal, respectivamente. Todas as quatro proteínas são protoxinas, as quais são processadas, através da ação de proteases digestivas em pH alcalino, após a ingestão pelas larvas dos insetos susceptíveis, liberando fragmentos menores que variam em torno de 40-45 kDa para as proteínas de 125-135 kDa (Angsuthanasombat et al, 1992), 30-35 kDa para a proteína de 65 kDa (Daí & Gill, 1993) e 25 kDa para a proteína citolítica de 28 kDa (Koni & Ellar, 1994).

Os genes que codificam estes polipeptídeos principais têm sido clonados, seqüenciados e os produtos de expressão analisados. De acordo com a nova nomenclatura proposta por Crickmore et al (1998), tais polipeptídeos são designados de Cry4Aa (125 kDa), Cry4Ba (135 kDa), Cry11Aa (68 kDa) e Cyt 1Aa (28 kDa). A análise da seqüência permitiu a identificação de dois outros genes na toxina: *cry10Aa*, codificando um polipeptídeo menor de 58 kDa (Thorne et al, 1986; Höfte & Whiteley, 1989) e *cyt2Ba*, codificando um polipeptídeo de 29,8 kDa (Guerchicoff et al, 1997).

As proteínas Cry4Aa e Cry4Ba apresentam uma estrutura similar com uma extremidade carboxi-terminal idêntica e uma extremidade amino-terminal (com 40% de similaridade) contendo os 5 blocos conservados presentes em quase todas as toxinas Cry, que corresponde ao fragmento tóxico (Delécluse et al, 1988; Pao-Intara et al, 1988; Yoshida et al, 1989). A proteína Cry10Aa não possui a extremidade carboxi-terminal das toxinas Cry4, e é composta de uma região amino-terminal variável contendo os 5 blocos conservados, desta maneira assemelhando-se com uma toxina Cry4 ativada. A proteína Cry11Aa distingue-se completamente das proteínas Cry4 e Cry10, incluindo somente a extremidade amino-terminal – a região essencial à toxicidade – o primeiro bloco (Schnepf et al, 1998). As proteínas citolíticas Cyt1Aa e Cyt2Ba não contêm nenhum desses blocos e diferem totalmente na estrutura.

As toxinas Cyt do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* se distinguem das toxinas Cry por apresentarem, em adição à sua ação inseticida específica para dípteros *in vivo*, uma ampla atividade citolítica para várias linhagens de células de insetos e eritrócitos *in vitro* (Knowles, 1994; Du et al, 1999).

A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos: o primeiro dependente dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, no qual está classificada a maioria dos genes

cry, e o segundo independente do processo de esporulação como o gene *cry3Aa*, cujos os determinantes genéticos são típicos da fase de crescimento vegetativo (Schnepf et al, 1998; Valadares-Inglis et al, 1998 Aronson, 2002).

Todas as proteínas do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* têm demonstrado toxicidade para larvas de mosquito, embora seu nível de atividade e especificidade sejam distintos. Estudos têm mostrado que, individualmente, nenhuma das proteínas que compõem o corpo paraesporal de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* é tão tóxica quanto o cristal nativo. Tal fato sugere que certas propriedades do cristal intacto, como fatores de virulência, o fazem mais ativo e, ou, que os componentes individuais estão atuando sinergisticamente (Porter, 1996; Schnepf et al, 1998).

Ambos os genes que codificam as toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* – genes *cry* e *cyt* – estão localizados em um megaplasmídeo transmissível de 128 kb denominado pBtoxis (Ben-Dov et al, 1999; Berry et al, 2002). Este plasmídeo abriga todos os elementos genéticos responsáveis pela toxicidade, além de inúmeras seqüências de inserção (ISs): IS231, F, V e W e IS240, A e B, as quais permitem a transposição, duplicação, rearranjo e modificação dos genes da toxina (Lereclus et al, 1993; Mahillon et al, 1994). Este plasmídeo também codifica duas proteínas (P19 e P20) que atuam promovendo a formação do cristal e aumentando a viabilidade celular, provavelmente por comportarem-se como uma chaperonina ou chaperone molecular (proteína que auxilia o enovelamento de outras proteínas, evitando vias incorretas que produziriam estados inativos ou agregados) (Wu & Federici, 1993; Manasherob et al, 2001).

A localização preferencial em plasmídeos, geralmente conjugativos, com uma freqüente associação a elementos genéticos móveis, determinam a grande diversidade desses genes e a conseqüente ocorrência de linhagens, contendo diferentes combinações dos mesmos; portanto, com perfis de toxicidade diferentes.

1.4 – A Estrutura das Toxinas de *B. thuringiensis*

Höfte & Whiteley (1989) compararam seqüências de aminoácidos entre a maior parte das protoxinas Cry até então conhecidas, apresentando especificidades variadas, e encontraram cinco regiões bem conservadas – designadas blocos 1 a 5 – na região amino-terminal ativa das

proteínas, intercaladas por regiões de seqüências variáveis (Lereclus et al, 1993; Knowles, 1994; Kumar et al, 1996; Schnepf et al, 1998). Por esse método, foram descritos cinco grupos de genes *cry* diferentes, organizados em algarismos romanos (I – V).

No entanto, como conseqüência do avanço da compreensão da biologia molecular de *B. thuringiensis*, novos genes *cry* foram seqüenciados e catalogados, originando diversas exceções dentro da classificação. Por essa razão, Crickmore et al (1998) propuseram uma nova classificação baseada somente na seqüência de aminoácidos codificados por genes, não levando em consideração o perfil de toxicidade. Atualmente estão descritos mais de 120 genes diferentes que são enumerados por algarismos arábicos contendo 46 classes com subdivisões (de *cry1* a *cry46*) (NCBI, 2004).

As proteínas Cry4A, Cry4B e Cry10A de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, quando comparadas, exibem alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos, que se restringe às cinco regiões distintas e definidas que constituem os blocos 1 a 5. No entanto, a proteína Cry11A apresenta significativa homologia para com as demais proteínas Cry de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* somente na região correspondente ao bloco 1, mostrando ainda um moderado grau de similaridade no bloco 2 (Kumar et al, 1996; Schnepf et al, 1998).

Todos esses blocos de aminoácidos conservados estão localizados internamente na molécula da toxina, sugerindo que o *B. thuringiensis* conserva estes blocos na intenção de formar um motivo estrutural comum entre as proteínas. Tal fato pode ser importante para a sua função, porém é improvável que estes blocos estejam envolvidos na ligação da toxina ao receptor, pois as proteínas do cristal têm uma especificidade inseticida bem diversificada (Yamanoto & Dean, 2000).

O alinhamento das proteínas Cry, como mencionado anteriormente, revelou a presença de cinco blocos de aminoácidos altamente conservados entre a maioria das proteínas. A figura 2, mostra a presença e a ausência de cada um desses blocos nos subgrupos das famílias das toxinas. Um outro fato evidente nesta figura, é a diversidade no comprimento entre as diferentes proteínas, em particular, um grupo extenso que possui proteínas com aproximadamente duas vezes o comprimento do restante destas. A parte estrutural localizada na extremidade carboxi-terminal das protoxinas de massa molecular de aproximadamente 130kDa, não é a região ativa

dessa toxinas (esta extremidade é digerida pelas proteases no intestino médio dos insetos), porém, acredita-se que esta extremidade esteja relacionada à formação e à estabilidade do cristal protéico, não influenciando diretamente nos fenômenos relacionados à toxicidade (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf et al, 1998).

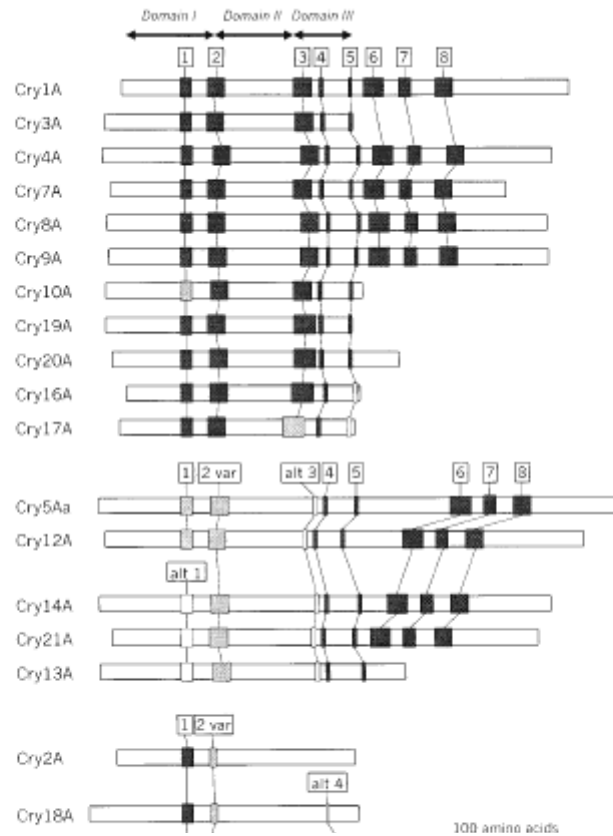


Figura 2: Posições dos blocos conservados entre as diferentes classes de δ -endotoxinas. A seqüência dos blocos são mostrados como cinza escuro, cinza claro ou branco para indicar alto, moderado ou baixo grau de homologia, respectivamente, na seqüência consenso de cada bloco conservado. (Reproduzido de Schnepf et al, 1998).

A estrutura cristalina correspondente às frações ativas das proteínas Cry3Aa (Li et al, 1991), Cry1Aa (Grochulski et al, 1995) e Cyt2A (Li et al, 1996) foram elucidadas através da técnica de cristalografia com raios-X. Ao analisar as proteínas Cry3A e Cry1Aa, verificou-se que estas compartilhavam cerca de 36% de identidade na seqüência de aminoácidos (Crickmore et al, 1998). Esta similaridade se reflete em suas estruturas tridimensionais, cujos correspondentes domínios podem ser praticamente sobrepostos. A proteína Cyt2A, no entanto, compartilha menos

que 20% de identidade na sequência de aminoácidos com as proteínas Cry1Aa e Cry3A, nenhuma surpresa, já que a estrutura da proteína Cyt2Aa é radicalmente diferente das outras duas. As estruturas das proteínas Cry1Aa, Cry3A e Cyt2A estão comparadas na Figura 3.

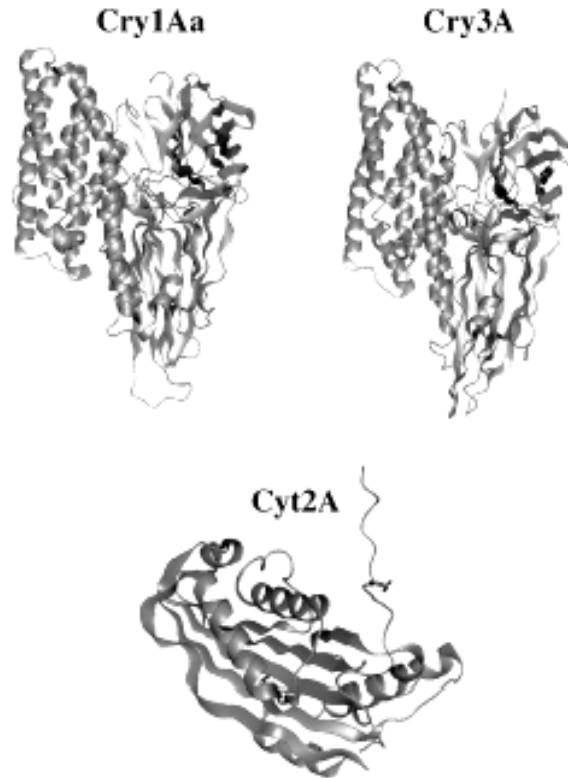


Figura 3: Estrutura tridimensional das proteínas Cry1A, Cry3A e Cyt2A. (Reproduzido de Schnepf et al, 1998).

A Cyt2A consiste de uma proteína de domínio único, cuja estrutura apresenta uma arquitetura α/β , onde as hélices formam a camada exterior e as folhas β permanecem encobertas dentro do cerne da proteína (Li et al, 1996; Gazit et al, 1997). Acredita-se que a proteína Cyt1A tenha uma estrutura similar (Schenpf et al, 1998).

Com base na conservação de blocos definidos, foi postulado que todas as toxinas Cry de *B. thuringiensis*, provavelmente possuem, conformação tridimensional similar à verificada nestas duas proteínas, a Cry3A e a Cry1Aa (Li et al, 1991; Gill, 1995; Grochulski et al, 1995; Kumar et al, 1996; Schenpf et al, 1998).

As proteínas Cry3A e Cry1A, ao contrário da proteína Cyt2A, possuem três domínios distintos. O domínio I consiste de um feixe de sete α -hélices anfipáticas, com a hélice 5 – hélice

hidrofóbica central – sendo circundada pelas hélices remanescentes. Devido a completa proteção da $\alpha 5$ pelas demais hélices, esta não entra em contato direto com as moléculas de solvente circulantes. O domínio II é composto por três folhas β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula, reunidas em um típico motivo em “chave grega”, organizado em um envoltório denominado β -prisma (Sankaranarayanan et al, 1996; Shimizu & Morikawa, 1996). O domínio III consiste de folhas β antiparalelas, formando uma estrutura tipo β -sanduíche, contendo a região conservada carboxi-terminal da maioria das proteínas Cry (Li et al, 1991; Gazit & Shai, 1995; Gill, 1995; Grochulski et al, 1995; Kumar et al, 1996; Gazit et al, 1998; Schenpf et al, 1998).

Recentemente, Gutierrez et al (2001) publicaram o primeiro modelo teórico da estrutura tridimensional de uma proteína da família Cry11. A estrutura da toxina díptera-específica Cry11Bb sintetizada pelo *B. thuringiensis* sorovar *medellin* foi obtida pelo grau de homologia da seqüência de aminoácidos baseado nas estruturas das proteínas Cry1Aa e Cry3Aa.

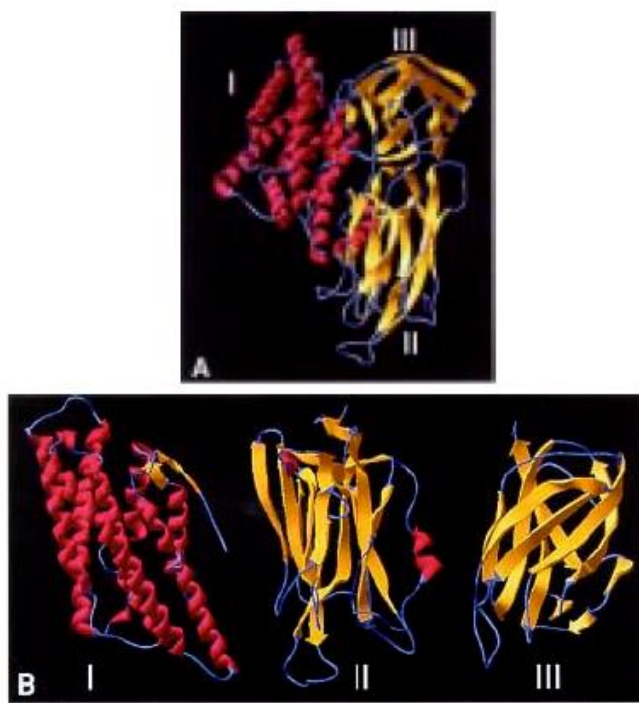


Figura 4: Representação da estrutura tridimensional da toxina Cry11Bb. **A:** Diagrama em fita da δ -endotoxina Cry11Bb, mostrando a organização dos domínios. **B:** Os três domínios são: I, um feixe de 9 α -hélices e duas fitas β curtas (fúcsia); II, reunião de três folhas β (base); III, um β -sanduíche (parte superior direita). (Reproduzido de Gutierrez et al, 2001).

Os autores ao compararem a estrutura das toxinas Cry1Aa e Cry3Aa com a da Cry11Bb, observaram que apesar do baixo grau de homologia na seqüência de aminoácidos, essas três toxinas, compartilharam uma estrutura tridimensional comum. O modelo estrutural apresentado na Figura 4, indica que a toxina Cry11Bb contem todas as características gerais das toxinas Cry (uma estrutura $\alpha + \beta$ com três domínios distintos), e as poucas diferenças encontradas foram localizadas nas alças do domínio II e III (Figura 5).

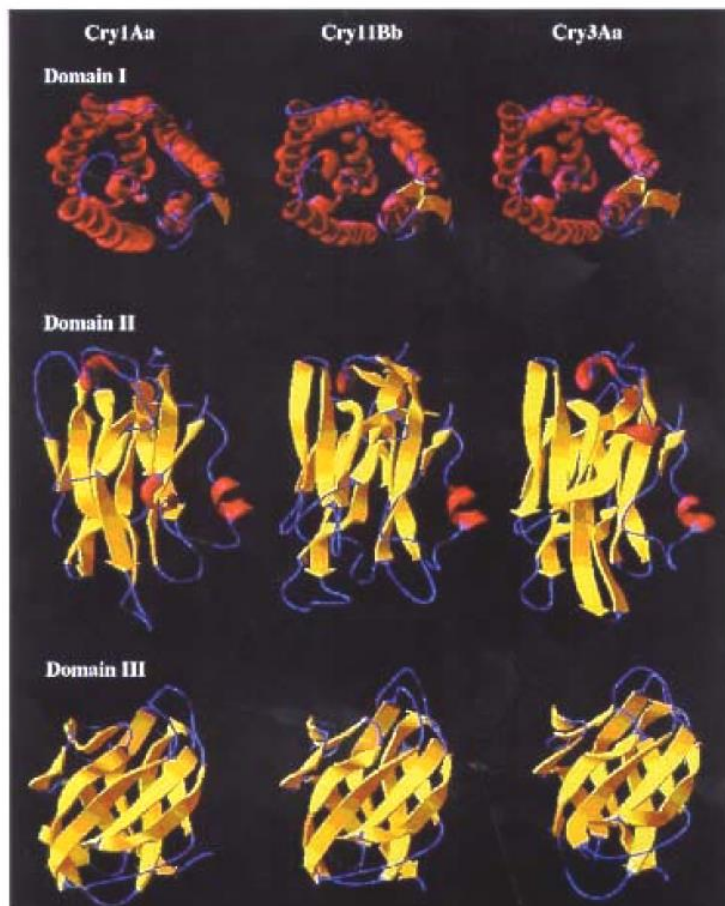


Figura 5: Comparação entre os domínios estruturais das proteínas Cry1Aa, Cry11Bb e Cry3A. No plano superior, o domínio I mostra que as três toxinas são quase idênticas. No plano interno do domínio II, as diferenças entre as três toxinas estão localizadas, especificamente, nas alças internas da figura. No plano inferior o domínio III não demonstra diferenças, exceto nas alças $\beta 16$ - $\beta 17$, localizada no meio da figura. (Reproduzido de Gutierrez et al, 2001).

Uma diferença estrutural significativa entre as toxinas lepidóptera-específica Cry1Aa, coleóptera-específica Cry3Aa e a díptera-específica Cry11Bb, foi observada nas alças do domínio II, o que corrobora as conclusões de estudos genéticos de que esta região está envolvida no reconhecimento e ligação a receptores específicos da superfície celular e portanto, considerada como a região determinante para especificidade dessas toxinas.

Todos os três domínios possuem atribuições funcionais específicas. A longa hélice hidrofóbica $\alpha 5$ e as hélices anfipáticas do domínio I, sugerem que este domínio pode ser responsável pela formação de poros líticos no epitélio intestinal do inseto-alvo. Em seus estudos, Gazit et al (1998) mostraram evidências da função estrutural desempenhada pelas hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ no revestimento dos poros de δ -endotoxinas, e propuseram um modelo tipo “guarda chuva” para a interação da δ -endotoxina com os fosfolipídeos da membrana. Neste modelo, as hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ inserem-se na membrana como um grampo helicoidal, de uma maneira antiparalela, enquanto que as hélices remanescentes se estendem sobre a superfície da membrana como varetas de um guarda chuva (Figura 6) (Gazit & Shai, 1995; Gazit et al, 1998).

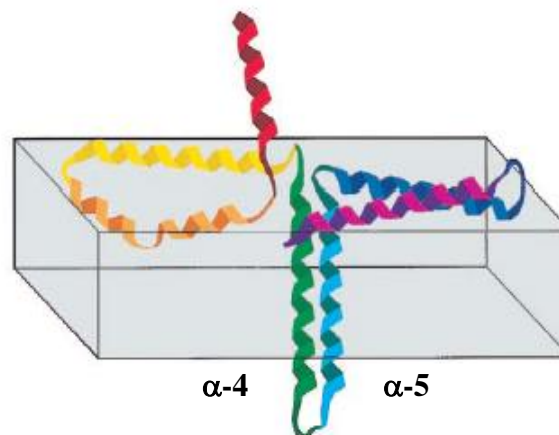


Figura 6: Representação esquemática do modelo “guarda-chuva”, proposto para representar as interações da δ -endotoxina Cry3A com membranas fosfolipídicas, mostrando a inserção das hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ na membrana, como um grampo helicoidal. As hélices estão coloridas de acordo com a seqüência do arco-íris.(Reproduzido de Gazit et al,1998).

Gazit et al (1998) ainda sugeriram que a hélice $\alpha 7$ poderia atuar como um sensor de ligação da δ -endotoxina ao seu receptor, devido a sua localização na interface entre o domínio formador do poro (domínio I) e o domínio de ligação ao receptor (domínio II). A hélice $\alpha 7$ iniciaria, assim, a alteração conformacional do domínio formador do poro (Gazit & Shai, 1995; Gazit et al, 1998).

Um outro modelo, denominado “canivete”, foi proposto por Hodgman e Ellar (1990) para a formação de poros na membrana. Neste modelo, baseado na similaridade proposta para a inserção da colicina A, as hélices altamente hidrofóbicas $\alpha 5$ e $\alpha 6$, que são unidas através de uma alça na extremidade da estrutura da δ -endotoxina, abririam-se como um canivete, inserindo-se na membrana (Figura 7). O restante da molécula permaneceria na superfície da membrana ou sobre o receptor (Knowles, 1994; Schenpf et al, 1998).

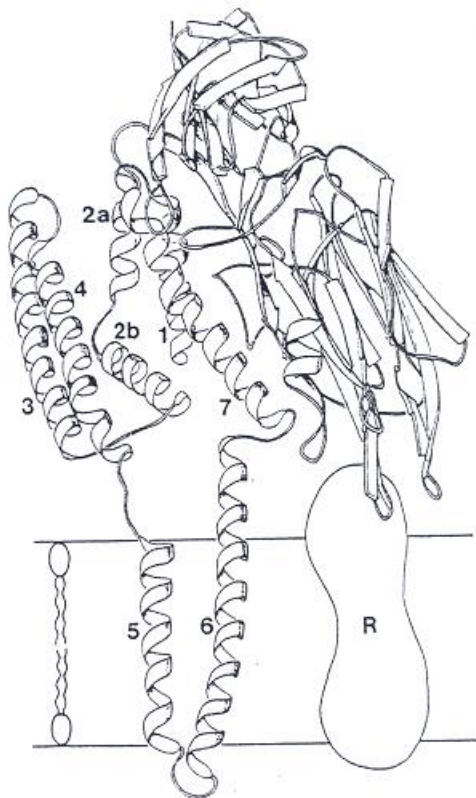


Figura 7: Representação esquemática do modelo “canivete”, proposto para representar as interações da δ -endotoxina Cry3A com membranas fosfolipídicas, mostrando a inserção das hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$ na membrana, como um grampo helicoidal. O receptor é indicado pela letra R. (Reproduzido de Knowles, 1994).

Recentemente, Loseva et al (2001) apresentaram novas considerações para a formação dos canais líticos na membrana fosfolipídica. Estes autores utilizaram vesículas fosfolipídicas (lipossomas) como modelo de membrana nos estudos experimentais. Suas conclusões relatam a ausência da alteração conformacional na maior parte do domínio formador do poro, diante sua ligação com a membrana, divergindo do modelo tipo “guarda chuva”, que sugere mudanças na estrutura total do domínio II (Gazit et al, 1998). Em princípio, os resultados obtidos correspondiam ao modelo “canivete”, com as hélices $\alpha 5$ e $\alpha 6$ atuando como uma lâmina (Hodgman & Ellar, 1990).

Em seus resultados, Loseva et al (2001) demonstraram que cada mudança no domínio I, envolve somente três α -hélices da extremidade N- terminal. Após o afastamento das hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$ do restante da estrutura da proteína, a superfície hidrofóbica formada pelos resíduos hidrofóbicos da 4^a, 5^a e 7^a hélices apresentam-se abertas, permitindo que as hélices sejam capazes de interagir com o cerne hidrofóbico da membrana fosfolipídica, formando um canal lítico. A superfície externa deste canal é formado de regiões hidrofóbicas das hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 7$ e seu lúmen é revestido pelos resíduos hidrofílicos do domínio II e III (Figura 8a,b,c). Portanto, um novo modelo foi proposto para a inserção das toxinas de *B. thuringiensis* na membrana plasmática, baseado na estrutura, já conhecida, da toxina Cry3A .

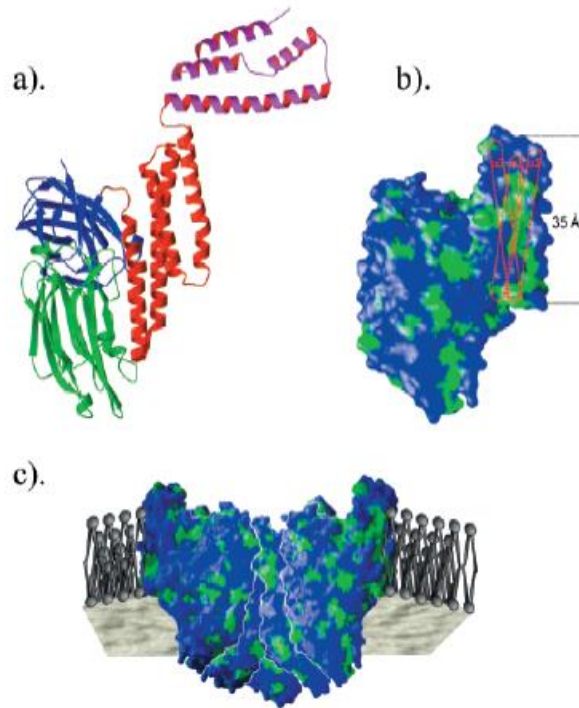


Figura 8: Modelo da interação da δ -endotoxina com a membrana lipídica. **(a)** Esquema da estrutura tridimensional da proteína Cry3A com as três α -hélices da porção N-terminal afastadas da estrutura. Os domínios I, II e III são mostrados em vermelho, verde e azul, respectivamente. **(b)** A superfície molecular das toxinas sem as hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$. As regiões hidrofóbicas da superfície são mostradas em verde. As projeções da três α -hélices omitidas são mostradas como cilindros. **(c)** Representação esquemática da interação da δ -endotoxina com a membrana lipídica. As hélices $\alpha 1$ - $\alpha 3$ na estrutura da δ -endotoxina não são mostrados. (Reproduzido de Loseva et al, 2001).

Cogita-se que o domínio II esteja associado à ligação da toxina com o receptor, pelo fato deste domínio conter segmentos que determinam a especificidade aos insetos, além de possuir algumas das seqüências de aminoácidos menos conservadas (hipervariáveis), nas várias δ -endotoxinas. A toxina ativada interage com uma proteína localizada na membrana apical das células colunares do intestino médio do inseto através das superfícies expostas das alças presentes no ápice das três folhas β deste domínio (Gazit & Shai, 1995; Kumar et al, 1996; Schenpf et al, 1998).

Diferentes classes de proteínas que ligam as toxinas aos receptores de vários insetos têm sido identificadas nas vilosidades apicais do epitélio intestinal (BBMVs). Três tipos de moléculas,

aminopeptidase N (Knight et al, 1994; Valaits et al, 1995; Gill et al, 1995), proteína caderina (Valdamudi et al, 1995) e um glicoconjugado aniônico (Valaits et al, 2001) têm demonstrado atuar como receptores para as toxinas Cry com afinidade para larvas de lepidópteros e coleópteros (Oddou et al, 1991; Garczynski et al, 1991; Sangadala et al, 1994).

Porém, Krieger et al (1999) isolaram das BBMV's de larvas de *Aedes aegypti*, duas proteínas de 65 e 62 kDa que apresentaram afinidade pelas toxinas Cry4B e Cry11A sintetizadas pelo *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, utilizando cromatografia de afinidade.

Buzdin et al (2002) mostraram que estas proteínas não possuem atividade leucina-aminopeptidase, uma característica presente em proteínas que reconhecem toxinas nas membranas de lepidópteros. Foi sugerido que durante a evolução, as toxinas mosquitocidas conseguiram se adaptar à uma outra classe de proteínas de membrana mais apropriadas, promovendo a interação efetiva das toxinas com a membrana do epitélio intestinal de larvas de dípteros.

Os autores também demonstraram os resultados obtidos com a interação das proteínas de 65 kDa e 62 kDa com toxinas ativas contra lepidópteros. A toxina Cry1Ab não conseguiu se ligar nas proteínas de 65 e 62 kDa, sugerindo que essas proteínas provavelmente não pertencem a classe de proteínas caderina, as quais são receptores da toxina Cry1Ab em lepidópteros. Já, a toxina Cry9A, ligou-se no suposto receptor para as toxinas Cry4B e Cry11A. Todavia, a Cry9A não competiu por esta ligação com as proteínas mosquitocidas e a ausência do efeito tóxico desta toxina em larvas de *Ae. aegypti* sugere que neste caso a ligação da proteína neste sítio é ineficiente para larvas de mosquitos. Segundo Bravo (1997), as moléculas da toxina Cry9A e as proteínas mosquitocidas possuem alguma similaridade apenas no domínio II, o qual é responsável pela ligação com o receptor.

A clivagem proteolítica de cinco α -hélices ($\alpha 1$ – $\alpha 5$) do domínio N-terminal da toxina Cry4B não afeta sua ligação com as proteínas de 65 e 62 kDa, porém, a remoção de 20-30 resíduos de aminoácidos da extremidade C-terminal da molécula destrói esta ligação. Foi sugerido que o fragmento C-terminal da toxina Cry4B, ao qual, corresponde o 2º e 3º elementos da estrutura β do domínio III, deve estar envolvido na ligação do receptor diretamente, ou, através da formação

de uma estrutura terciária necessária para a molécula efetuar sua ligação com o suposto receptor (Hodgman & Ellar, 1990; Li et al, 1991).

Muthukumar et al (1987) sugeriram que as toxinas mosquitocidas sintetizadas pelo *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* deveriam ser glicoproteínas e que resíduos de carboidratos estariam envolvidos na ligação com o receptor. No entanto, Buzdin et al (2002) demonstraram que resíduos monossacarídeos não participaram da ligação das toxinas mosquitocidas com as proteínas de 65 kDa e 62 kDa de larvas de *Ae. aegypti*.

Tal fato sugere que, nestes casos, a toxina interage com o receptor sem o envolvimento de carboidratos, divergindo da interação da toxina Cry1Ac com o receptor aminopeptidase N, quando resíduos da N-acetil-D-galactosamina (NAGal) do receptor estão envolvidos na ligação da toxina (Knowles et al, 1991).

Recentemente, Pootanakit et al (2003) baseados em experimentos com a técnica da reação de polimerização em cadeia da transcriptase reversa (RT-PCR) identificaram duas isoformas da aminopeptidase N transcritas no epitélio intestinal de larvas de *Ae. aegypti*. Segundo estes autores, vários insetos possuem múltiplas isoformas da aminopeptidase N expressas nos tecidos do intestino médio. Em estudos anteriores, foram identificadas e clonadas quatro, três e duas isoformas da aminopeptidase N em *Bombyx mori*, *Plutella xylostella* (Chang et al, 1999; Nakanisshi et al, 2002) e *Manduca sexta* (Knight et al, 1995; Denolf et al, 1997) no intestino médio larval, respectivamente. Todas essas isoformas, em geral, demonstraram sua capacidade de ligação com as toxinas Cry.

O domínio III estaria relacionado com a estabilidade estrutural e integridade da molécula da toxina. Embora a função deste domínio, localizado próximo à extremidade carboxi-terminal da protoxina, não esteja bem definida, cogita-se que poderia ter um papel no processamento da protoxina, na ligação à receptores e na inserção da proteína na membrana, além de estar envolvido na formação de canais iônicos (Li et al, 1991; Dean et al, 1996; Kumar, 1996). Schenpf et al (1998) não excluíram nenhuma dessas funções para o domínio III nas proteínas Cry, pois, existem evidências que sugerem uma função para este domínio na ligação a receptores em outros sistemas.

Inicialmente, foi sugerido que a função do domínio III estava relacionado com a proteção da toxina da digestão pelas proteinases (Li et al, 1991). Todavia, um estudo neste domínio demonstrou que o domínio III da proteína Cry1Ac, é necessário, além do domínio II, para a especificidade em *Heliothis virescens* (Ge et al, 1991), sugerindo que este domínio teria sítios ou um sítio de ligação com o receptor, porém, a região específica relacionada à ligação da toxina com o sítio de ligação não tinha sido identificada (Lee et al, 1995; Dean et al, 1996).

Experimentos de mutagênese sítio-específica nas toxinas Cry de *B. thuringiensis* confirmam que os domínios I e III – e possivelmente o domínio II – estariam envolvidos na inserção da toxina na membrana apical de células epiteliais do intestino médio do organismo alvo, isto porque alterações de aminoácidos nas supostas alças de ligação ao receptor do domínio II, assim como alterações na suposta superfície proximal da membrana do domínio I, afetaram a ligação irreversível da toxina ao receptor (Dean et al, 1996; Schenpf et al, 1998).

A proteína citolítica Cyt1Aa não apresenta seqüências de homologia com as toxinas Cry. Uma das proteínas da família Cyt, designada de Cyt2Aa, teve sua estrutura tridimensional determinada, através da técnica de cristalografia com raio-X (Figura 9) (Li et al, 1996). Uma vez que a Cyt1Aa e a Cyt2Aa compartilham 39% de identidade e 70% de similaridade em suas seqüências de aminoácidos, acredita-se que estas duas proteínas possuam estruturas bastantes similares (Gazit et al, 1997).

A δ -endotoxina Cyt2Aa, a qual é encontrada em inclusões paraesporais de *B. thuringiensis* sorovar *kyushuensis*, é uma proteína de domínio único, de arquitetura α/β , porém apresentando uma topologia incomum, que consiste de duas camadas externas de grampos α -hélice (hélice A-B e C-D), flanqueando um cerne de folhas β combinadas (fitas 1 a 7) (Li et al, 1996; Gazit et al, 1997). Acredita-se que as fitas β_5 , β_6 e β_7 – que exibem um caráter anfifílico e são suficientemente longas para atravessar a zona hidrofóbica da bicamada lipídica – sejam responsáveis pela ligação e formação de poros na membrana celular do inseto-alvo. As α -hélices de Cyt 2A, apesar de apresentarem caráter anfifílico, são curtas, o que as torna inadequadas para exercer tais funções (Li et al, 1996).

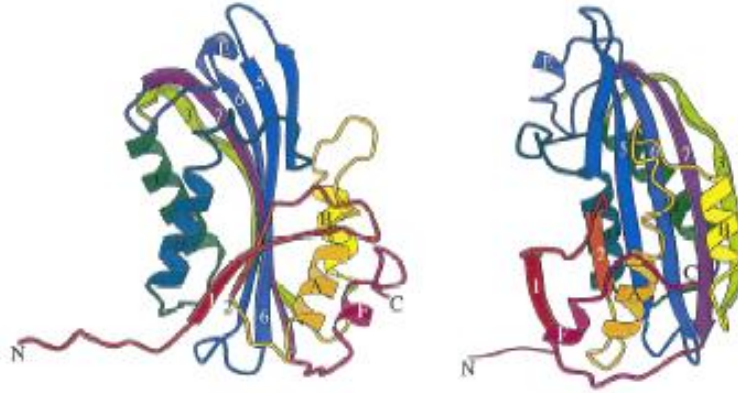


Figura 9: Estrutura global do monômero Cyt2A. Diagrama em fita, mostrando que as camadas helicoidais são feitas de dobras em grampo e que uma fita na folha β é composta por dois fragmentos não contíguos ($\beta 2$ e $\beta 4$), com sentidos opostos. O declive colorido (vermelho na região N-terminal ao magenta na fração C-terminal) segue a ordem do arco-íris) mostra que, na seqüência peptídica, o par de hélices A-B precede o par de hélices C-D, o qual, precede as fitas internas da folha. No espaço entre $\beta 1$ e $\beta 2$, insere-se a equivalente fita $\beta 1$ de outro monômero, para formar uma folha dimérica. (Reproduzido de Li et al, 1996).

Gazit et al (1997), através de estudos utilizando peptídeos sintéticos, sugeriram que as hélices A e C, da toxina citolítica, seriam os principais elementos estruturais envolvidos na ligação desta toxina aos fosfolipídeos da membrana, atuando ainda na reunião de monômeros da toxina para formar poros transmembrana.

Du et al (1999) demonstraram a interação de duas toxinas citolíticas de *B. thuringiensis*, Cyt1Aa e Cyt2Aa, com a bicamada fosfolipídica e sua estrutura ao redor da membrana através da proteólise usando lipossomas como um sistema modelo. Uma mudança conformacional na toxina diante da ligação com a membrana foi detectada comparando o perfil proteolítico da toxina em torno da membrana com a toxina solubilizada em uma solução tampão. Quando a toxina ao redor da membrana foi exposta à presença de peptídeos sintéticos, novos pontos de clivagem foram demonstrados entre a extremidade N-terminal da α -hélice e a extremidade C-terminal da β -fita na estrutura da toxina Cyt1A e Cyt2B.

Estes novos sítios de clivagem proteolítica estão concentrados em três regiões principais da seqüência da toxina Cyt. Cada uma destas regiões encontram-se mais ou menos na mesma

posição das duas seqüências alinhadas das toxinas Cyt, e isto está de acordo com a proposta de Li et al (1996) de que a toxina Cyt1Aa e Cyt2Aa têm uma estrutura terciária similar.

A estrutura inserida na membrana mantém sua função como poro de membrana, mesmo após a remoção dos segmentos da extremidade N-terminal pela proteólise. Esses resultados sugerem e portanto confirmam que os poros são constituídos pela parte da molécula composta pelas três principais β -fitas ($\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 7$) da extremidade C-terminal da toxina (Li et al, 1996; Du et al, 1999).

Em outro estudo, Promdonkoy & Ellar (2000) marcaram três das β -fitas ($\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 7$) com acrilodan e demonstraram que as β -fitas encontram-se em um ambiente apolar. As β -fitas também mostram-se protegidas do ataque das proteases solúveis, sugerindo que as fitas atravessam a bicamada fosfolipídica antes de se posicionarem paralelamente a sua superfície.

1.5 – Mecanismo de Ação das Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

As proteínas de *B. thuringiensis* são sintetizadas como protoxinas cristalinas insolúveis, que necessitam ser ingeridas pelas larvas dos insetos susceptíveis para que possam exercer o seu efeito tóxico (Knowles & Dow, 1993; Li et al, 1996). A insolubilidade é conferida, em parte, por ligações dissulfídicas intercadeias, e as condições alcalinas no intestino médio desses insetos são adequadas para promover a rápida dissolução destas protoxinas (Gill et al, 1992; Knowles, 1994; Schenepf et al, 1998).

Estas proteínas (protoxinas) são proteoliticamente convertidas em polipeptídeos tóxicos menores, através de proteases do intestino médio das larvas. Por exemplo, no intestino médio de larvas de mosquito, cujo o pH varia de 7,5 a 10, têm sido detectadas proteases como tripsina e quimiotripsina. Como resultado, fragmentos tóxicos protease-resistente, contendo o domínio N-terminal das protoxinas, são liberados. As regiões removidas durante a ativação, situam-se nos primeiros poucos aminoácidos da fração N-terminal e a metade C-terminal da molécula (Höfte & Whiteley, 1989). Nestes trechos, encontram-se resíduos de cisteína, os quais não são necessários para toxicidade (Choma & Kaplan, 1992). A metade C-terminal é removida por clivagem

seqüencial de fragmentos de 10-35 kDa, que são rapidamente degradados a pequenos peptídeos (Gill et al, 1992; Schenepf et al, 1998; Knowles, 1994).

A solubilização dos cristais protéicos é determinante para especificidade dos isolados de *B. thuringiensis* à espécie alvo, tanto pela alcalinidade do sistema digestivo quanto pela composição dos cristais *B. thuringiensis* (Aronson et al, 1991). As diferenças no grau de solubilidade, às vezes, explicam as diferenças na proporção de toxicidade entre as proteínas Cry (Du et al, 1996). Uma redução na solubilidade pode ser considerado um mecanismo potencial para a resistência nos insetos (McGaugley & Whalon, 1992).

As diferenças existentes no intestino larval dos insetos afetam a solubilização e, ou, eficiência de processamento das inclusões protéicas, sendo um fator co-determinante para a especificidade do cristal protéico (Höfte & Whiteley, 1989; Porter et al, 1993).

Haider & Ellar (1989) realizaram um estudo mostrando que uma protoxina pode ser convertida em toxina ativa para dípteros ou lepidópteros, dependendo da origem das enzimas proteolíticas. Estes autores trataram uma proteína de 130 kDa de *B. thuringiensis* sorovar *aizawai* – tóxica as larvas de dípteros e lepidópteros – com extrato do intestino médio do lepidóptero *Pieris brassicae*, e a toxina ativada mostrou-se tóxica para ambas as larvas de *P. brassicae* e *Ae. aegypti*; todavia, quando ativada pelas proteases do intestino de larvas de *Ae. aegypti*, a toxina resultante apresentou toxicidade somente para as larvas de mosquito. Logo, os autores concluíram que a dupla especificidade observada, surgia como consequência do processamento diferencial de uma única proteína do cristal protéico (Porter et al, 1993; Honeé & Visser, 1993).

As toxinas Cry ativadas ligam-se prontamente a receptores específicos, localizados nas vilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino médio dos insetos susceptíveis (Hofmann et al, 1998). Trata-se de um processo que abrange dois estágios: uma etapa reversível e outra irreversível (Van Rie et al, 1989; Ibarra et al, 1993; Rajamohan et al, 1995). A etapa irreversível envolve a firme ligação entre a toxina e o receptor e, ou, a inserção da toxina na membrana apical (Kumar et al, 1996; Schenepf et al, 1998). Porém, tem sido considerado que a ligação irreversível está exclusivamente associado com a inserção da toxina na membrana (Ibarra et al, 1993; Liang et al, 1995; Rajamohan et al, 1995).

Portanto, esta etapa é considerada um fator importante na determinação do espectro entomopatogênico das δ -endotoxinas (Hofman et al, 1988; Van Rie et al, 1990; Fiúza et al, 1996). Esses autores mostram que existe uma correlação positiva entre a ligação *in vitro* da toxina no receptor intestinal e a toxicidade, *in vivo*. Por outro lado, outros estudos descrevem que o reconhecimento do receptor é necessário, mas não é suficiente para provocar a toxicidade, sugerindo a existência de outros fatores relacionados ao modo de ação das δ -endotoxinas (Wolfersberger, 1990).

Os modelos de receptores atualmente descritos mostram que um inseto pode apresentar, em quantidade variável, diversas classes de receptores que podem ser reconhecidos por diferentes toxinas (Hua et al, 2001, citado por Fiúza et al, 2001).

Ravoahangimalala et al (1993) investigaram a localização das toxinas Cry11A e Cyt1A no intestino médio de larvas de mosquitos *Anopheles gambiae* após a ingestão de cristais purificados de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, utilizando métodos imunológicos. Ambas as toxinas foram detectadas em uma região específica nas vilosidades apicais de células do intestino médio posterior de larvas de *An. gambiae*. Através destas observações, os autores concluíram que as células do intestino médio do mosquito consistiam no alvo primário para as toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* e supondo, que a ligação a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais da membrana era a etapa inicial de ação das toxinas. Embora a ligação específica nas microvilosidades apicais da membrana não seja sempre uma correlação quantitativa com a toxicidade, sugere um evento importante para a mesma (Wolfersberger, 1990; Ferré et al, 1991).

Posteriormente, Ravoahangimalala & Charles (1995) resolveram investigar a capacidade individual de cada uma das quatro toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* – Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A, de se ligarem, *in vitro*, nas vilosidades apicais do intestino médio posterior e no ceco gástrico de larvas de *An. gambiae*, empregando métodos de detecção imunológica. Estes autores observaram que as toxinas Cry4A, Cry4B e Cry11A encontram-se fortemente associadas as microvilosidades das células da porção posterior e do ceco gástrico,

embora demonstrem um sinal menos intenso no ceco gástrico, e um sinal de intensidade muito menor nas membranas apicais de células da porção anterior do intestino médio.

Com base nesses resultados, foi sugerido que estes sinais poderiam refletir a presença de receptores específicos, e que as diferenças de intensidade observadas ao longo das distintas regiões do intestino estariam correlacionadas com a afinidade, e, ou, concentração destes receptores.

A toxina Cyt1A foi detectada nas microvilosidades de todas as células do intestino médio, exceto nas células do cárdia. Esta detecção, também demonstrada nas células da porção posterior, pode estar correlacionada com a habilidade da toxina Cyt1A em induzir poros através de membranas biológicas sem requerer a participação de nenhum receptor específico.

Deste modo, os autores concluíram que a toxina Cyt1A é capaz de se ligar a quase todas as regiões do intestino médio de larvas de *An. gambiae*, porém na presença das δ -endotoxinas Cry de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, a ligação parece ser direcionada para as regiões do intestino médio, nas quais as toxinas Cry se ligam à receptores específicos (Li et al, 1996).

Yamagiwa et al (2001) investigaram as propriedades de ligação da toxina Cry4A de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* nas vilosidades apicais de células do intestino médio de *Culex pipiens*, *in vitro* e *in vivo*, após a ingestão da toxina marcada ou não com digoxigenina, utilizando métodos de detecção imuno-histoquímica. A toxina Cry4A foi detectada nas vilosidades apicais de células do intestino médio posterior e no ceco gástrico, não sendo detectado no intestino médio anterior, demonstrando a afinidade e, ou, a presença de receptores específicos nas distintas regiões do epitélio intestinal de larvas de *Cx. pipiens*.

Os autores referidos sugeriram a presença de sítios de ligação específica para a toxina Cry4A nas células-alvos. Subseqüentemente, utilizando a técnica de detecção imunológica, foram detectados no intestino médio de larvas de *Cx. pipiens*, proteínas de ligação para a toxina Cry4A, variando de 30 a 18 kDa.

Estudos da interação entre a toxina Cry4A e as vilosidades apicais do epitélio intestinal revelaram duas vias paralelas e distintas induzindo a uma ligação irreversível na superfície das células-alvo. A interação de uma das duas vias depende da ligação inicial reversível da toxina ativada com receptores específicos, e em seguida, a ligação irreversível associada com a inserção da toxina na membrana, induzindo a formação do canal funcional (Liang et al, 1995).

Porém, a outra interação apresenta-se como uma associação direta e não-específica da toxina Cry4A, conduzindo a uma inserção irreversível da toxina com a membrana (Figura 10). Segundo os autores, provavelmente esta interação não estaria envolvida na toxicidade desta proteína para larvas de *Cx. pipiens*, pois neste modelo, a toxina estaria no estado de agregação e, ou, conformação não-funcional. Acredita-se que uma mudança conformacional própria e, ou, uma oligomerização apropriada da toxina são essenciais para a atividade tóxica, sendo efetuada com a ligação da toxina a receptores específicos, conduzindo a citotoxicidade.

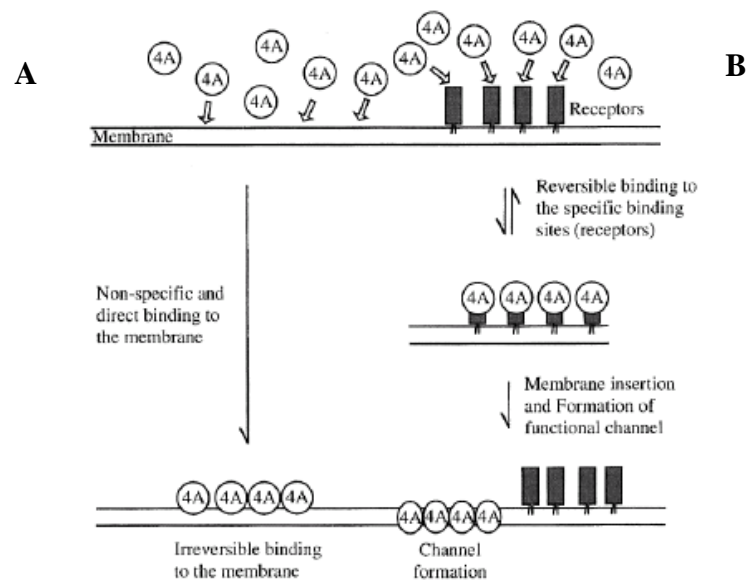


Figura 10: A representação esquemática do modo de interação na membrana pela toxina Cry4A. Existem duas vias paralelas distintas, conduzindo a ligação irreversível na superfície da célula-alvo. **(A)** Associação direta e não-específica da toxina Cry4A, com a superfície da membrana. **(B)** Ligação inicial reversível da toxina ativada com receptores específicos, e em seguida, a inserção da toxina na membrana, induzindo a formação do canal funcional. (Reproduzido de Yamagiwa et al, 2001).

Com base nas observações anteriores, Ruiz et al (2004) investigaram a ligação, *in vivo*, da toxina mosquitocida Cry11Bb, sintetizada pelo *B. thuringiensis* sorovar *medellin*, no intestino médio de larvas de *An. albimanus*, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, utilizando métodos de análise imuno-histoquímica. A proteína Cry11Bb foi detectada nas vilosidades apicais do intestino médio posterior e no ceco gástrico nas três espécies de mosquitos avaliadas, e conseqüentemente, as células epiteliais do intestino médio podem ser consideradas como o principal alvo desta toxina. A localização preferencial da toxina Cry11Bb e de outras toxinas mosquitocidas no ceco gástrico e na porção posterior nas larvas de mosquitos, podem ser devido a uma concentração elevada de receptores e, ou, de moléculas com afinidade de ligação.

Adicionalmente, a toxina Cry11Bb foi detectada nos túbulos de Malpighi das três espécies de mosquitos estudadas e na membrana basal das células epiteliais do intestino médio de *Ae. aegypti*. Estes resultados confirmam que o sítio primário da ação das toxinas Cry11 é a membrana apical das células epiteliais do intestino médio das larvas de mosquito.

Existem inúmeras evidências mostrando que os receptores de alta afinidade, presentes no intestino médio do inseto, são determinantes na especificidade dos cristais protéicos de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, e que uma toxicidade elevada pode ser o resultado desta alta afinidade, ou da presença de um número maior de receptores (Honée & Visser, 1993). No entanto, existem alguns estudos em que a sensibilidade dos insetos à toxina não foi proporcional à sua afinidade ao receptor de ligação, sugerindo que a presença de sítios de ligação conduzem, necessariamente, à atividade inseticida (Porter et al, 1993; Schnepf et al, 1998). Outros estudos relatam a correlação existente entre a taxa de ligação irreversível e a formação de canais de íons com a toxicidade, fato que foi observado em *Lymantria díspar* (Kumar et al, 1996; Schnepf et al, 1998).

Após a ligação reversível do fragmento tóxico a um receptor específico nas vilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino médio dos insetos susceptíveis, as toxinas Cry de *B. thuringiensis* inserem-se irreversivelmente na membrana plasmática da célula intestinal, induzindo a formação de canais iônicos ou poros não-específicos na membrana do inseto-alvo. Tal evento conduz ao desequilíbrio iônico e osmótico entre o citoplasma e o meio externo à célula (Gill et al, 1992). As análises histopatológicas realizadas após a intoxicação dos

insetos mostram a destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais, vacuolização do citoplasma, lise celular e rompimento da integridade intestinal, levando o inseto à morte por inanição ou septicemia (Knowles & Dow, 1993; Gill, 1995; Schnepf et al, 1998).

Recentemente, Cavados et al (2004) investigaram os efeitos ultraestruturais e histopatológicos das δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* no intestino médio de larvas de *Simulium pertinax*, infectadas com dosagens crescentes destas toxinas, durante um período de exposição de até quatro horas, empregando metodologias de microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Os autores observaram fragmentos celulares nos espaços entre o epitélio e a membrana peritrófica e degeneração nuclear das células na porção anterior do intestino médio nos cortes histológicos das larvas expostas as protoxinas hidrolisadas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*. Na porção posterior do intestino médio, encontrou-se além dos danos já mencionados, vacúolos, causados pela hipertrofia celular e rupturas aparentes nas microvilosidades. Nas junções laterais das células foram evidenciados uma vacuolização do citoplasma e núcleos deformados.

Adicionalmente, os autores observaram que a progressão dos danos estava correlacionada diretamente à concentração utilizada do inseticida biológico e, ou, o tempo de exposição ao agente supressor (Cavados et al, 2004)

Os referidos autores ressaltam ainda a importância dos dados obtidos em contribuir para o conhecimento dos sítios que são afetados pelas toxinas do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, bem como um melhor entendimento do modo de ação dessa bactéria usada como bioinseticida para o controle de larvas de *S. pertinax*.

As diversas linhagens de *B. thuringiensis* produzem, em adição às δ -endotoxinas, uma série de outras toxinas, as quais podem ou não participar da ação entomopatogênica. Dessas, a principal é a proteína Cyt, uma citolisina de ação inespecífica sintetizada pelos sorovares

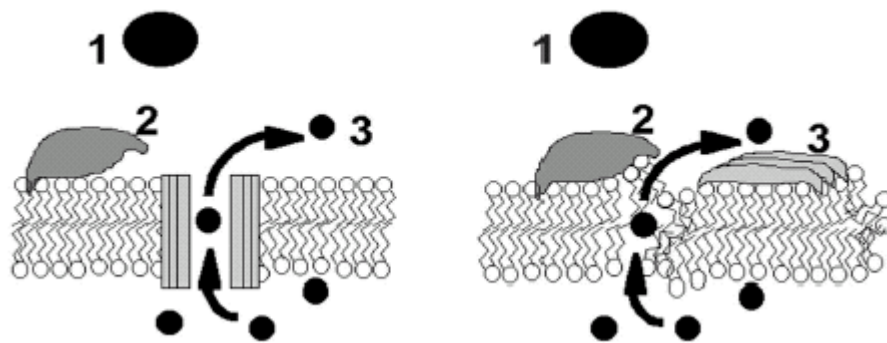
israelensis, *kyushuensis*, *medellin* e *jegathesan*, sendo acumulada no cristal protéico juntamente com as δ -endotoxinas típicas de cada subespécie (Arantes et al, 2002).

Acredita-se que a toxina Cyt1A atue, basicamente, por um mecanismo similar ao das proteínas Cry, formando sob certas condições, poros cátion-seletivos de tamanhos similares aqueles formados pela ação das δ -endotoxinas Cry, e agindo por um mecanismo de lise colóide-osmótica. Segundo este modelo, proposto por Knowles & Ellar (1987), a formação dos poros, induzida pela toxina após a ligação à fosfolipídeos insaturados na membrana celular, promoveria o rápido fluxo de íons através destes orifícios, acompanhado pelo influxo de água, com a finalidade de restabelecer o equilíbrio iônico. Em consequência, haveria o entumescimento celular, ocasionado o rompimento da integridade da membrana celular e eventual lise.

Entretanto, uma vez que a toxina citolítica e as toxinas Cry possuem estruturas totalmente diferentes, inevitavelmente devem ser formados poros com estruturas desiguais. As etapas limitantes na formação dos poros pelas δ -endotoxinas Cry são a ligação ao receptor, a qual é reversível e a inserção na membrana, que é uma etapa irreversível. No caso das δ -endotoxinas Cyt, *in vitro*, a etapa limitante parece ser a sua agregação após a ligação na membrana fosfolipídica (Gill, 1995; Li et al, 1996).

É correntemente aceito que a atividade citolítica das δ -endotoxinas Cyt, *in vitro*, não envolva receptores específicos, com a toxina citolítica inserindo-se espontaneamente em membranas contendo fosfolipídeos insaturados (Thomas & Ellar, 1983; Li et al, 1996). Porém, estudos têm questionado que a formação de poros pela toxina citolítica, *in vivo*, possa ser mediada por um receptor específico (Ravoahangimalala et al, 1993; Ravoahangimalala & Charles, 1995). Todavia, na presença das δ -endotoxinas Cry, de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, a ligação da toxina Cyt1A parece ser direcionada para as regiões do intestino médio, nas quais as toxinas Cry ligavam-se a receptores específicos (Li et al, 1996; Schnepf et al, 1998). Tal fato pode sugerir a existência de uma elevada associação entre as toxinas Cry e a toxina Cyt1A, o que pode ser a base das interações sinérgicas junto aos dípteros (Tabashnik, 1992; Gill et al, 1992; Wu et al, 1994).

Atualmente, dois mecanismos de ação são propostos para as toxinas citolíticas: (a) múltiplos da toxina formam um poro estrutural no interior da membrana (Promdonkoy et al, 2003) ou (b) as toxinas citolíticas exercem seu efeito através da ação detergente menos específica (Butko, 2003). Estes dois modelos foram recentemente revistos por Butko, (2003). Algumas características dos modelos propostos estão presentes na Figura 11, a qual resume os principais resultados das duas hipóteses do mecanismo de ação dependente do pH, pelo qual a toxina Cyt1A permeabiliza a membrana lipídica.



Modelo Formador de Poros

A proteína insere na bicamada lipídica.
 A proteína tem uma estrutura específica.
 Os poros são bem definidos – proteína revestida.
 Os lipídeos estão bem organizados.
 As membranas permanecem, apesar do

Modelo Detergente

A proteína não insere na bicamada lipídica.
 A proteína encontra-se desestruturada.
 Os poros são temporários.
 Os lipídeos estão desordenados.

Figura 11: Os dois modelos hipotéticos do modo de ação da proteína Cyt1A. (1) A toxina solúvel difunde na fase extracelular. (2) Durante a passagem pela membrana, as toxinas modificam a conformação estrutural e ligam-se aos lipídeos. (3) As toxinas ou inserem-se na bicamada lipídica, onde formam poros oligoméricos, ou permanecem (possivelmente agregadas) dispersas na superfície da membrana, onde encontram-se fragmentados dentro do complexo lipídeo/toxina. As moléculas intracelulares (círculos pretos) fluem ou através dos poros ou através das falhas na bicamada lipídica. (Reproduzido de Butko, 2003).

1.6 - Efeitos das Interações Sinérgicas na Potência das Toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*

Diversos estudos têm revelado que a expressiva toxicidade das linhagens de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* está correlacionada com as interações sinérgicas entre suas proteínas Cry (Crickmore et al, 1995; Poncet et al, 1995), e especialmente entre a toxina Cyt1A e as proteínas Cry (Ibarra & Federici, 1986; Wu et al, 1994).

Recentes estudos, têm demonstrado que Cyt1A pode protelar o desenvolvimento da resistência das proteínas Cry em mosquitos (Georghiou & Wirth, 1997), superando a resistência destas toxinas caso esta venha ocorrer (Wirth et al, 1997). Por exemplo, os níveis de resistência maiores que 900 vezes para a toxina Cry11A em populações de laboratório de *Cx. quinquefasciatus* foram suprimidos ou reduzidos completamente quando esta proteína foi combinada com quantidades subletais da Cyt1A (Wirth et al, 1997). Recentemente, foi demonstrado que Cyt1A superou altos níveis de resistência da toxina binária do *B. sphaericus* 2362 (Wirth et al, 2000a) e ampliou o espectro de ação para larvas de *Ae. aegypti* (Wirth et al, 2000b).

Wu e Chang (1985) foram os primeiros a evidenciar que quando frações protéicas de corpos de inclusão purificados de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* foram homogeneizadas e ensaiados contra larvas de *Ae. aegypti*, a atividade larvicida de algumas combinações testadas mostrava-se maior do que a soma das toxicidades específicas de cada fração protéica, individualmente. Inúmeros estudos, confirmam as interações sinérgicas entre as várias toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (Chilcott & Ellar, 1988; Angsuthanasombat et al, 1992; Chang et al, 1993; Delécluse et al, 1993; Wu et al, 1994; Crickmore et al, 1995; Poncet et al, 1995).

Na avaliação desses estudos, é difícil estabelecer a contribuição exata de cada toxina (individualmente ou em combinação) na toxicidade total do corpo paraesporal. Segundo os referidos autores, parte do problema diz respeito principalmente às diferentes condições experimentais utilizadas nesses trabalhos, seja em relação aos ensaios biológicos, ou quanto à

forma como as proteínas são oferecidas às larvas (Angsuthanasombat et al, 1992; Chang et al, 1993; Delécluse et al, 1993; Poncet et al, 1995).

Crickmore et al (1995) tentaram superar esses problemas ensaiando as toxinas sob condições experimentais constantes. Esses autores compararam as toxicidades individuais das quatro principais toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* – Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A – expressas em uma linhagem mutante acristalífera desta mesma espécie, através de ensaios biológicos contra larvas de *Ae. aegypti*.

Através dos valores obtidos para a concentração letal mediana (CL₅₀), Crickmore et al (1995) verificaram que, sob as condições experimentais utilizadas, a toxina Cry11A foi a que apresentou maior ação tóxica, sendo duas vezes mais tóxica que a Cry4B, e cerca de cinco vezes mais ativa que as δ -endotoxinas Cry4A e Cyt1A. No entanto, empregando-se concentrações maiores – superiores à CL₉₅ - a toxina Cyt1A tornava-se mais efetiva contra essa espécie de mosquito, seguida pelas toxinas Cry11A, Cry4B e Cry4A, em ordem decrescente de atividade.

As interações sinérgicas foram demonstradas em todas as combinações de toxinas testadas, embora o grau desta interação fosse dependente da combinação. Um efeito sinérgico maior foi obtido quando a toxina Cyt1A era um dos componentes integrantes da mistura, conforme pode ser visto nas combinações que forneceram os maiores efeitos interativos, listados em ordem decrescente: Cry4A + Cyt1A; Cry4B + Cyt1A e Cry4A + Cry4B + Cyt1A. Porém, nenhuma das misturas testadas, inclusive a que continha as quatro toxinas, mostrou ser tão ativa contra larvas de *Ae. aegypti* quando o cristal nativo de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (Crickmore et al, 1995).

Os autores sugeriram que a ausência de outros componentes menores do cristal protéico na mistura, tal como a toxina Cry10A, que poderia contribuir para a toxicidade global do cristal, explicaria, em parte, os resultados obtidos. Isso porque, em estudos anteriores, esta proteína mostrou-se tóxica para larvas de *Ae. aegypti*, além de atuar sinergisticamente com a toxina Cry4B (Poncet et al, 1993).

Com o objetivo de estudar o papel da proteína Cyt1A de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, Delécluse et al (1991) inativaram geneticamente o gene *cyt1A*, testando a cepa recombinante em bioensaios contra *Ae. aegypti*, *Cx. quiquefasciatus* e *An. stephensi*. A ausência da proteína de 28 kDa não afetou a cristalização dos outros componentes tóxicos do corpo paraesporal, porém, aboliu a atividade hemolítica dos cristais de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*.

Contudo, os autores verificaram que a inativação do gene *cyt1A*, produzia uma cepa com toxicidade similar à cepa selvagem, sugerindo que a proteína Cyt1A não era essencial para atividade larvicida, pelo menos com relação as três espécies testadas.

Porém, este resultado deve ser analisado sob um outro aspecto, pois uma vez que a presença da proteína Cyt1A no corpo de inclusão não dilui seu potencial larvicida, isto pode significar que a toxina é um componente importante no arsenal larvicida do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, podendo como tal, promover uma série de interações sinérgicas (Schnepf et al, 1998).

1.7 – Resistência dos Insetos as Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

A evolução de resistência tem sido um mecanismo de defesa dos insetos contra as táticas de controle, haja visto o que acontece com os inseticidas químicos, onde mais de 500 espécies de insetos têm se apresentado resistentes a um ou a múltiplos inseticidas químicos (Georghiou & Lagunes-Tejeda, 1991). McGaughey (1985) notificou em populações de *Plodia interpunctella*, o primeiro registro da presença de insetos resistentes às formulações de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki*.

Desde então, diversos estudos mostraram que os insetos podem desenvolver níveis variáveis de resistência às toxinas do *B. thuringiensis* (Tabashnik, et al, 1994; Ferré et al, 1995; Schnepf et al, 1998). Diversas dessas colônias foram selecionadas sob condições de laboratório, após maciça pressão de seleção. A utilização dessa técnica é importante pois permite o estudo de mecanismos de resistência e promove estratégias de manejo e conseqüentemente tenta-se superar a resistência em populações no campo (Van Rie & Ferré, 2000).

A resistência obtida em laboratório não é comparável à obtida no campo, pois populações de insetos mantidos em laboratório são geneticamente isoladas, tendo menor variabilidade do que as populações naturais. No campo, podem ocorrer fatores que contra-selecionem os insetos resistentes, como: fertilidade, viabilidade e diluição do gene da resistência por cruzamentos com insetos susceptíveis, além da ocorrência de inimigos naturais que podem retardar o aparecimento de resistência (Van Rie & Ferré, 2000).

Em princípio, o mecanismo de resistência dos insetos às proteínas de *B. thuringiensis* está relacionada às várias etapas do modo de ação desta bactéria, que incluem: a redução na solubilização das proteínas (McGaughey & Whalon, 1992); o processamento proteolítico das toxinas (Oppert et al, 1997) e à diminuição da afinidade para ligação dos receptores da membrana das células epiteliais do intestino médio do inseto às proteínas Cry (Mohammed et al, 1996).

Insetos da Ordem *Lepidoptera*, como a *P. interpunctella*, lagarta do algodão, *Spodoptera littoralis*, *P. xylostella* e a *Heliothis virescens* são exemplos de populações de insetos resistentes à toxina Cry1A (Van Rie et al, 1990; Schnepf et al, 1998).

Até o momento, não foi detectado nenhuma resistência em campo de populações de insetos da Ordem *Diptera*, tratados com *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* que, apesar do uso constante no controle de insetos vetores de doenças, em programas estabelecidos há mais de 10 anos na África Ocidental, na Alemanha e na França, não foi registrada resistência, provavelmente porque a ação do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* se deva ao sinergismo de cinco toxinas diferentes (4 Cry e 1 Cyt). Porém, experimentos mostram que a resistência às toxinas de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* pode ser facilmente selecionada quando os seus respectivos genes são clonados individualmente (Arantes et al, 2002).

1.8 – A Genética e a Biologia Molecular de *B. thuringiensis*

O mapeamento genético do cromossomo da linhagem de *B. thuringiensis* sorovar *thuringiensis* HD2 foi construído através do alinhando dos 16 fragmentos obtidos pela digestão com a enzima de restrição *NotI*. Os fragmentos variam de 15 a 1.350kb e o tamanho total do

cromossomo foi de 5,4Mb (Carlson et al, 1993). Mapas físicos têm sido construídos para estudar e comparar as linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, e têm demonstrado que os cromossomos de ambas as espécies apresentam uma organização genômica similar próxima à metade da origem de replicação, embora demonstrem também grande variabilidade na extremidade terminal (Carlson et al, 1996).

A análise dos resultados da eletroforese de campo pulsado indicou que a maioria dos isolados de *B. thuringiensis* possuem vários elementos extracromossômicos, alguns circulares e outros lineares (Carlson et al, 1994). Sabe-se que, as proteínas que compõem o cristal paraesporal são geralmente codificados por grandes plasmídeos (González et al, 1981). Porém, a presença de genes *cry* no cromossomo bacteriano das linhagens de *B. thuringiensis* já foram descritos (Whiteley & Schnepf, 1986, Carlson et al, 1993).

As espécies de *B. thuringiensis* abrigam uma grande variedade de elementos de transposição, incluindo seqüências de inserção e transpósons (Mahillon et al, 1994). No *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*, um elemento de inserção IS231 (IS231W) encontra-se adjacente ao gene *cryIIAa* (Rezsöhazy et al, 1993). Apesar do elemento de inserção IS231 esteja frequentemente associado com os genes *cry*, as seqüências do DNA relacionadas com este elemento também foram encontrados em cepas de *B. cereus* e *B. mycoides*.

Recentemente, Jung et al (2001) isolaram uma nova seqüência de inserção de uma cepa autoaglutinante de *B. thuringiensis*. A análise da seqüência do DNA revelou alta homologia com a família IS231 e foi denominado IS231M. Baseado na seqüência nucleotídica, a nova seqüência de inserção IS231M apresenta alta homologia com a IS231F (presente no *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*) e IS231G (presente no *B. thuringiensis* sorovar *darmstadiensis*), e baixa com as seqüências de inserção IS231V (presente no *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*) e IS231W.

O gene *cry4A* do sorovar *israelensis* está flanqueado por duas seqüências repetitivas em orientações opostas denominada de IS240 (Bourgouin et al, 1988). Esta seqüência encontra-se amplamente distribuída em linhagens de *B. thuringiensis*, presente principalmente, em cepas díptera-específica, sugerindo que a IS240 deve facilitar a mobilização dos genes tóxicos entre diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Rosso & Delécluse, 1997). Nesse estudo, os autores

demonstraram que 67% das cepas de *B. thuringiensis* testadas, inclusive todas as cepas mosquitocidas conhecidas, possuem no mínimo um elemento de inserção relacionado com IS240, indicando que este elemento representa uma família de seqüências de inserção com várias variantes. Seqüências relacionadas com IS240 também foram detectadas em cepas de *B. cereus* e *B. mycoides* (Léonard et al, 1997).

A síntese dos cristais protéicos pelo *B. thuringiensis* são coordenados por uma série de mecanismos que ocorrem na transcrição, pós-transcrição e pós-tradução, da expressão dos genes *cry* neste organismo (Agaisse & Lereclus, 1994; Baum & Malvar, 1995 citado por Schnepf et al, 1998).

O mecanismo de transcrição dos genes *cry* tem sido considerado um exemplo típico de expressão específica dependente da esporulação. Todavia, estudos recentes da expressão do gene *cry3Aa* revelaram que esta hipótese pode ser questionada. Por essa razão, torna-se necessário distinguir-se entre os genes *cry* que são expressos durante a fase estacionária, ou seja, dependentes da esporulação, daqueles que são expressos independentemente da fase esporulada do crescimento bacteriano (Schnepf et al, 1998).

A expressão dos genes *cry* dependente da esporulação vêm sendo estudada extensivamente em linhagens de *B. subtilis*, o qual tem fornecido informações detalhadas sobre os complexos mecanismos do controle temporal e espacial desse processo de diferenciação (Losick & Stragier, 1992; Errington, 1993). Na transcrição gênica, o processo de esporulação é controlado por sucessivos fatores de ativação designados fatores sigma, os quais ligam-se no core da RNA polimerase para a transcrição direta nos promotores específicos de esporulação (Moran, 1993).

Já na expressão dos genes *cry* independentes da esporulação, o gene *cry3Aa*, do *B. thuringiensis* sorovar *morrisoni* tenebrionis NB176, coleóptero-específico, demonstrou ser expresso durante a fase de crescimento vegetativo (Sekar, 1988; De Souza et al, 1993). Análises das fusões de transcrição do gene *lacZ* indicaram que o promotor do gene *cry3Aa* é considerado um promotor fraco, porém, significativamente expresso durante a fase vegetativa de crescimento, sendo ativado no final do crescimento exponencial até o estágio II, e permanecendo ativo até o estágio IV da esporulação (Agaisse & Lereclus, 1994; Salamitou et al, 1996) .

No controle pós-tradução, as proteínas Cry sintetizadas durante a fase de esporulação, formam inclusões cristalinas na célula-mãe. Dependendo da composição da protoxina, os cristais têm várias formas: bi-piramidal (Cry1), cubóide (Cry2), retangular (Cry3A), irregular (Cry3B), esférico (Cry4A e Cry4B) e rombóide (Cry11A). Esta capacidade que as protoxinas possuem em formar cristais diminui sua susceptibilidade em uma degradação proteolítica prematura. Todavia, os cristais são solubilizados rapidamente no intestino das larvas de insetos tornando-se biologicamente ativos. A estrutura e as características da solubilidade do cristal protéico presumivelmente dependem de fatores como a estrutura secundária da protoxina, a energia das pontes dissulfetos e a presença de componentes específicos das cepas de *B. thuringiensis* (Schnepf et al, 1998).

Inúmeros fatores, tais como, fosfolipases C, hemolisinas, proteinases, quitinases, diferentes das proteínas Cry e que podem estar envolvidos na virulência de cepas de *B. thuringiensis* foram identificados e caracterizados (Lechner et al, 1989; Budarina et al, 1994; Baida & Kuzmin, 1995; Donovan et al, 1997; Kramer & Muthukrishnan, 1997; Hansen & Hendriksen, 1998). Como os genes *cry*, os genes dos fatores de virulência também encontram-se localizados nos cromossomos ou em plasmídeos. Lechner et al (1989) localizou o gene da fosfolipase C específico para o fosfatidil-inositol no cromossomo de linhagens de *B. thuringiensis*. Tanto o *B. thuringiensis* quanto o *B. cereus* produzem três tipos de fosfolipase C, cujos genes já foram clonados. Uma fosfolipase específica codificada pelo gene *plcA*, uma que degrada a esfingomiéline, codificada pelo gene *cerB*, e uma lecitinase, codificada por *plcB*. Todos estes fatores de virulência são sintetizados no final da fase exponencial do crescimento e secretadas no meio de cultura (Carlson et al, 1996).

A determinação da organização genética do *B. thuringiensis* através da eletroforese de campo pulsado em conjunto com a hibridização confirmou esta observação e também localizou o gene da fosfolipase C específico para o fosfatidil-colina e a enterotoxina hemolítica HblA no cromossomo bacteriano (Carlson et al, 1996; Lövgren et al, 1998). O mapeamento genético do cromossomo do *B. thuringiensis* revelou que esses genes de virulência estão todos dispersos no cromossomo bacteriano (Lövgren et al, 1998).

1.9 – Caracterização Molecular de δ -endotoxinas

As propriedades entomopatogênicas do *B. thuringiensis* têm impulsionado as pesquisas para selecionar estirpes desta bactéria com atividade tóxica para diferentes ordens de insetos (Schnepf et al, 1998).

Estudos recentes descreveram novas proteínas Cry que exibem atividade tóxica para larvas de diversos insetos que compõem as Ordens Díptera, Lepidoptera e Coleoptera, assim como contra Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, Mallophaga e Isoptera (Fontes-Castilhos et al, 2002; Pinto et al, 2003); além de outros organismos, tais como ácaros, nematóides, platelmintos e protozoários (Koo et al, 1995; Estruch et al, 1996; Lambert et al, 1996; Lee & Gill, 1997; Omolo et al, 1997; Restrepo et al, 1997; Sasaki et al, 1997; Shevelev et al, 1997; Chang et al, 1998; Orduz et al, 1998).

Para auxiliar na caracterização das propriedades entomopatogênicas, existem técnicas, ao nível molecular, que podem auxiliar na identificação de novas proteínas do cristal em linhagens de *B. thuringiensis* (Bravo et al, 1998; Masson et al, 1998; Shevelev et al, 1998). São técnicas que corroboram na identificação de genes *cry* e *cyt* responsáveis pela toxicidade das bactérias entomopatogênicas.

Atualmente, é grande o número de métodos de caracterização de bactérias tanto ao nível de informação genotípica, DNA ou RNA (composição de bases, padrões de restrição, hibridização, seqüenciamento e sondas), informações fenotípicas baseadas em proteínas (padrão de proteínas totais ou eletroforese de isoenzimas) e marcadores quimiotaxonômicos (ácidos graxos, ácidos micólicos e quinonas), quanto em informações baseadas nos caracteres expressos como morfologia, bioquímica, fisiologia, sorologia e fagotipagem.

A identificação dos genes *cry* em novos isolados é possível por técnicas de hibridização DNA-DNA, usando-se genes que codificam o cristal protéico, marcados radioativamente, com sondas (Visser, 1989). Assim, poderíamos comparar a patogenicidade das linhagens, mas ocorre que, em muitas delas, coexistem mais de um gene da toxina, impedindo o uso desta técnica para uma classificação geral de *B. thuringiensis* (Crickmore et al, 1998).

Com o desenvolvimento da técnica de amplificação enzimática *in vitro* de seqüências de DNA utilizando a reação de polimerização em cadeia (PCR) (Mullis, 1987), com oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) dos genes conhecidos, permitiu-se a identificação dos genes das toxinas em diferentes isolados de *B. thuringiensis* (Carozzi et al, 1991; Cleave et al, 1993; Céron et al, 1994; Cerón et al, 1995; Ben-Dov et al, 1997; Ogunjini et al, 2000; Ben-Dov et al, 2001; Pórcar & Juárez-Péres, 2003).

Carozzi et al (1991) propuseram a PCR como uma metodologia rápida e exata para a identificação de novas estirpes e a predição da atividade inseticida de novos isolados de *B. thuringiensis* portadores de novos genes *cry*. Os referidos autores sugeriram que estirpes que produzissem perfis de PCR incomuns, seriam selecionados para novas abordagens que proporcionassem a identificação e caracterização dos novos genes.

Quando a reação de polimerização em cadeia está associada à técnica de detecção do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) (Swaminathan & Mattar, 1993), ambos contribuem para identificação de novas variantes dos genes das toxinas (Priest et al, 1994; Kuo & Chak, 1996). Os oligonucleotídeos iniciadores com homologia para regiões variáveis tem sido usados para identificar subgrupos dentro da família do gene *cry1* (Bourque et al, 1993; Cerón et al, 1994).

A análise filogenética de sorovares de *B. thuringiensis* através da associação da ribotipagem com o RFLP permitiu a classificação e o posicionamento de uma ampla variedade de estirpes de *B. thuringiensis*. Segundo Joung & Côté (2001), as estirpes de *B. thuringiensis* apresentaram-se relativamente homogêneas e compartilharam um alto grau de afinidade em relação ao DNA genômico.

Porém, ao contrário das técnicas mencionadas, que dependem da seqüência de DNA altamente conservada, a amplificação aleatória de DNAs polimórficos, ou RAPD-PCR, tem por objetivo detectar polimorfismos no DNA, dos quais existe pouca informação de sua seqüência nucleotídica. Dois grupos concomitantemente descreveram este método. Williams et al (1990) tinham como objetivo principal o mapeamento genômico e nomearam esta técnica de RAPD-PCR, denominação mais comum atualmente. Já o outro grupo buscava a obtenção de

fingerprintings (impressões digitais) e marcadores genéticos (Welsh & McClelland, 1990), sendo a técnica denominada então, AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*).

Em ambos os trabalhos, o RAPD-PCR ou AP-PCR, baseiam-se no uso de uma seqüência nucleotídica pequena e randômica (*primer* ou iniciadores), que se anelam ao DNA molde nas fitas paralelas em orientação oposta. Uma DNA polimerase termoestável sintetiza, então, uma nova seqüência complementar, situada entre os dois oligonucleotídeos iniciadores, dando origem a novos fragmentos que servirão como moldes para as reações subseqüentes. É importante lembrar que os oligonucleotídeos iniciadores possuem seqüência arbitrária mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim, em lugares específicos do genoma (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al, 1990).

A amplificação exponencial do DNA, entre sítios internos aos iniciadores utilizados produz quantidades suficientes de fragmentos, que permite a detecção dos mesmos em gel de agarose corado por brometo de etídio. Devido aos oligonucleotídeos terem, em geral, 10 bases nitrogenadas, existe uma alta probabilidade de haver múltiplos sítios de anelamento ao longo do genoma, sendo que os fragmentos amplificados diferenciar-se-ão quanto ao tamanho. Quando separados por eletroforese, os diferentes fragmentos amplificados formam então, o perfil de RAPD-PCR ou RAPD-PCR *fingerprinting* (impressão digital genômica).

Entretanto, vale lembrar que para a amplificação de um fragmento RAPD no genoma em análise, duas seqüências de DNA complementares ao iniciador arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (menos que 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os polimorfismos ou diferenças em padrão de bandas vistos na eletroforese, podem ser causados pelos seguintes fatores: presença ou ausência de sítios de anelamento do iniciador no DNA molde; deleção ou inserção de bases sítio de anelamento (alteram a habilidade destes de se ligarem ao DNA); inserções que provocam um aumento no tamanho da seqüência a ser amplificada, podendo superar a processamento do DNA polimerase que, então, não polimeriza novos fragmentos, ou deleções que reduzem o tamanho da seqüência alvo (Williamms et al,

1990). Os polimorfismos podem indicar diferenças inter ou intra específicas, sendo portanto úteis para fins de diagnóstico ou na epidemiologia, como marcadores moleculares de DNA.

A reação RAPD-PCR requer vários cuidados a fim de que haja reprodutibilidade. Como já mencionada anteriormente, a reação requer um DNA molde, DNA polimerase termoestável, oligonucleotídeo iniciador e também desoxiribonucleotídeos livres (dNTPs), ocorrendo em tampão apropriado para a atividade enzimática, com presença de íon metálico divalente (Mg^{+2}). Na prática, as proporções destes componentes requerem um ótimo de concentração. Excesso ou falta de um destes componentes levam à não obtenção de resultados reprodutíveis ou géis de difícil interpretação (Williams et al, 1993).

Como em toda técnica de PCR, três temperaturas são utilizadas a cada ciclo de amplificação, destinando-se respectivamente a desnaturação, anelamento e polimerização. No caso particular do RAPD-PCR, a temperatura de anelamento é de suma importância, pois se for muito baixa, poderá diminuir a “estringência” do anelamento, resultando no aumento de pareamento incompleto entre o iniciador e o DNA molde, com produção de amplicons não reprodutíveis. Em contrapartida temperaturas altas levam ao não anelamento, pois como já dito anteriormente, os iniciadores são em torno de 10 pares de bases.

Finalmente, deve-se padronizar o número de ciclos a serem executados, pois quantidades insuficientes de ciclos levam a um baixo rendimento do produto amplificado e um excesso de ciclos, aumenta a quantidade e a complexidade de produtos inespecíficos.

O RAPD-PCR tem sido muito utilizado no estudo de relações fenéticas, identificação e epidemiologia de muitos organismos, tais como, bactérias e fungos entomopatogênicos (Brousseau et al, 1993; Leal et al, 1994; Pattanayak et al, 2001), bactérias fitopatogênicas (Ferreira et al, 2000) e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Oakay et al, 1996; Ghelardi et al, 2002). A técnica de RAPD-PCR tem sido amplamente empregada para diferenciar organismos relacionados (Bassam et al, 1992; Hadrys et al, 1992; McClelland & Welsh, 1994; Daffonchio et al, 1999) baseado no polimorfismo dos perfis da análise de RAPD.

Malkawi et al (1999), com a técnica de RADP-PCR, detectaram o polimorfismo genético entre 60 estirpes de *B. thuringiensis* isolados de solos de diferentes localidades da Jordânia. Tem sido demonstrado que sorovares de *B. thuringiensis* podem ser diferenciados e identificados com base nos *fingerprintings* (impressões digitais genômica) da análise de RAPD e mesmo cepas localizadas num mesmo sorotipo podem ser distinguidas (Brousseau et al, 1993).

Woodburn et al (1995), ao utilizarem a técnica de RAPD-PCR, demonstraram que cepas patogênicas de *B. sphaericus* não possuíam afinidade com as cepas não patogênicas. Stephan et al (1994) e Stephan (1996) aplicaram esta técnica para diferenciar estirpes de *B. cereus*, *B. lentus* e *B. licheniformis*. Ronimus et al (1997) utilizando o RADP-PCR, obtiveram a identificação de espécies de *Bacillus* termofílicos e mesofílicos. Já, Nilsson et al (1998) desenvolveram um procedimento utilizando o RAPD-PCR para a tipagem em grande escala de cepas de *B. cereus*. Zahner et al (1999), conseguiram identificar um marcador molecular para cepas mosquitocidas de *B. laterosporus*, ao utilizar o iniciador OPA1 na técnica de RAPD-PCR.

Oliveira et al (2004) identificaram em linhagens de *B. laterosporus* um amplicon de 900pb usando o iniciador OPA11 em análise de RAPD-PCR. Esse amplicon não foi detectado em outras espécies de *Brevibacillus* fenotipicamente relacionadas, sugerindo que este marcador seja específico para *B. laterosporus*, o qual se mostra útil no isolamento e identificação de novas cepas bacterianas desta espécie.

Hansen et al (1998) demonstraram que o método molecular como hibridização colonial é apropriado para uma extensa triagem dentro de uma coleção de culturas. Porém, quando os resultados da hibridização estão associados com a análise do perfil de RAPD-PCR, os isolados bacterianos podem ser agrupados através dos DNA *fingerprintings* e pelo conteúdo genético, por meio dos quais, novas abordagens pela PCR com iniciadores específicos, podem ser realizadas mais efetivamente.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Gerais

O principal objetivo deste estudo foi utilizar métodos fenotípicos e genotípicos para avaliar o grau de similaridade intra-específico entre estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis*, buscando elucidar a existência ou não de homogeneidade entre estas estirpes, isoladas de diferentes nichos ecológicos e distintos locais.

2.2 – Específicos

- Determinar a atividade biológica tóxica das estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*
- Avaliar o comportamento das estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* mediante emprego de determinados antimicrobianas
- Estimar o peso molecular das proteínas presentes nas estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* através da eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio/ SDS-PAGE
- Utilizar a eletroforese de isoenzimas a fim de se estabelecer o tipo eletroforético de cada estirpe autoaglutinante, através da taxonomia numérica, com a finalidade de determinar a similaridade entre as estirpes isoladas
- Detectar o polimorfismo genético através da técnica de amplificação aleatória de DNAs polimórficos - RAPD-PCR, entre as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* isoladas de diferentes nichos ecológicos e correlacionar o perfil do polimorfismo do DNA amplificado aleatório com a atividade biológica apresentada nos bioensaios qualitativos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Cepas Bacterianas Empregadas e Suas Procedências

A Tabela 1 apresenta 29 estirpes de *B. thuringiensis* usadas neste estudo, sendo 28 estirpes autoaglutinantes, isoladas no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, e o *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 sorotipo flagelar H:14, cepa considerada de referência pelo Instituto Pasteur de Paris, utilizada atualmente, também, como princípio ativo de inseticidas biológicos bacterianos comerciais. Todas as culturas encontram-se mantidas sob a forma liofilizada, na Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos, do Laboratório de Fisiologia Bacteriana.

Tabela 1: Fontes e locais de isolamento das linhagens de *Bacillus thuringiensis* utilizadas neste estudo.

Procedência	Sorovar/Sorotipo ¹	Fontes de Isolamento	Região de Isolamento
LFB-FIOCRUZ			
584	<i>israelensis</i> /H:14	Larvas de Culicídeos	Israel
853	autoaglutinante	Pimenta-do-reino	Rio de Janeiro/RJ ²
859	autoaglutinante	Pimenta-do-reino	Rio de Janeiro/RJ
894	autoaglutinante	Pimenta-do-reino	Rio de Janeiro/RJ
897	autoaglutinante	Pimenta-do-reino	Rio de Janeiro/RJ
907	autoaglutinante	Solo úmido	Rio de Janeiro/RJ
966	autoaglutinante	Solo úmido	Rio de Janeiro/RJ
968	autoaglutinante	Solo úmido	Rio de Janeiro/RJ
969	autoaglutinante	Solo úmido	Rio de Janeiro/RJ
1028	autoaglutinante	Rizosfera de vegetação rasteira	Rio de Janeiro/RJ
1035	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP ³
1036	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1037	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP

... continuação

1038	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1039	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1041	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1042	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1043	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1044	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Caraguatatuba/SP
1061	autoaglutinante	Larvas de <i>Simulium</i> sp.	Guapimirim/RJ
1062	autoaglutinante	Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	Iguaba Grande/RJ
1067	autoaglutinante	Solo arenoso	Ilha de Itacuruçá/RJ
1068	autoaglutinante	Solo arenoso	Rio das Ostras/RJ
1070	autoaglutinante	Rizosfera de vegetação rasteira	Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ
1071	autoaglutinante	Solo úmido	Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ
1072	autoaglutinante	Solo arenoso	Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ
1073	autoaglutinante	Solo úmido	Paineiras, Rio de Janeiro, RJ
1074	autoaglutinante	Solo úmido	Paineiras, Rio de Janeiro, RJ
1076	autoaglutinante	Solo úmido	Serra dos Órgãos, Teresópolis, RJ

Legenda:

1 - Autoaglutinante = autoagregante. Células autoaglutinantes em solução de NaCl 0,85% e não pelo anti-soro flagelar específico.

2 – RJ = Rio de Janeiro

3 – SP = São Paulo

3.2 – Confirmação da Posição Taxonômica das Cepas Bacterianas

As cepas isoladas foram submetidas às provas bioquímicas, fisiológicas e citomorfológicas próprias para o estudo taxonômico de bactérias do Gênero *Bacillus*, que seguem as recomendações do Centro de Referência da Organização Mundial de Saúde para *Bacillus* entomopatogênicos, do Instituto Pasteur de Paris, também segundo Gordon et al (1973); Cowan & Steel (1974); Sneath (1986) e Vasconcellos & Rabinovitch (1994).

3.2.1 – Identificação Morfológica

3.2.1.1 – Método de Coloração de Gram

Foi realizado segundo a técnica de Hucker (1922), citado por Conn et al (1957).

3.2.1.2 – Dimensionamento das Células na Fase Vegetativa de Crescimento

Para cada cepa estudada, foram tomadas medidas de 10 células vegetativas, comprimento e largura, em 10 campos diferentes da lâmina através da observação por microscopia óptica direta (1000X), em lâminas coradas pelo Método de Gram, de culturas com 18-24 horas de crescimento a 30°C em Ágar Nutriente. Considerou-se para o comprimento das células, o valor médio de cada conjunto de medidas dimensionáveis.

3.2.1.3 – Evidenciação do Esporo e do Corpo Paraesporal

Foi realizado através da observação por microscopia óptica direta (contraste de fase), de montagem úmida contendo suspensão em água destilada entre lâmina e lamínula, de culturas de 48 horas de crescimento a 30°C em Ágar Nutriente. Observou-se a predominância do tipo de esporo, elipsoidal ou cilíndrico, a posição do esporo no esporângio, central, subterminal ou terminal, o esporângio quanto à sua deformação ou não, bem como a presença ou não de corpo paraesporal.

3.3 – Provas Bioquímicas e Fisiológicas

3.3.1 – Crescimento Anaeróbico

Foi utilizado o meio Brewer Anaerobic-Agar (Difco), conforme Gordon et al (1973). Fórmula em g/L: Triptona – 5; Proteose-peptona – 10; Extrato de lêvedo – 5; Dextrose – 10; Cloreto de Sódio – 5; Tioglicolato de sódio – 2, Formaldeído sulfoxilato de sódio – 1; Ágar-ágar – 15; Água destilada q.s.p., pH 7,2 ± 0,1, ajustado com solução de 1N de NaOH. Após a distribuição de 6mL por tubos de ensaio de 15x150mm, esterilizou-se em autoclave a 120°C por 20minutos.

A inoculação foi feita com auxílio de uma agulha umedecida com crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente, sendo transferida por picada até quase o fundo do tubo. Os crescimentos foram pesquisados ao longo das picadas, principalmente a partir de 1cm abaixo da superfície. As observações foram feitas por 7 dias. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. megaterium* ATCC 14581 (negativo).

3.3.2 – Hidrólise do Amido

Foi utilizado o meio Ágar Nutriente acrescido de amido solúvel na proporção de 0,2%, de acordo com Claus & Berkeley (1986). Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a autoclavação e resfriamento a 45°C a mistura foi distribuída assepticamente (15mL) em placas de Petri com 15x90mm.

As placas de Ágar Amido foram divididas em cinco partes iguais e em cada parte foi inoculada com 5µL de um crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente da cultura com auxílio de uma pipeta. Após a incubação por 24 horas, a hidrólise do amido foi testada, revelando-se com vapores de iodo. A presença de uma zona de transparência incolor ao redor e sob o crescimento indicava a produção de amilase, ou seja, hidrólise positiva. Os crescimentos das culturas não hidrolíticas do amido, deixavam o meio de cultura com uma coloração azul intensa. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. sphaericus* ATCC 14577 (negativo).

3.3.3 – Fermentação de Carboidratos

Os açúcares testados foram adicionados ao seguinte meio básico (Gordon et al, 1973; Claus & Berkeley 1986), em g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; Extrato de lêvedo – 0,2; e Água destilada q.s.p. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1N antes de se adicionar 15mL de solução de Púrpura de bromocresol a 0,04%. Foram distribuídos 100mL do meio básico em balões. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Os carboidratos empregados foram: D(+) - glicose, L(+) - arabinose, D(+) - manitol e D(+) - xilose.

As soluções dos carboidratos foram preparadas separadamente e na concentração de 20%, sendo autoclavadas a 120°C durante 15 minutos. A adição das soluções de carboidratos ao meio

básico foi realizada assepticamente na proporção de 5mL para cada balão. Seguiu-se homogeneização e distribuição asséptica de 5mL por tubos de ensaio de 15x120mm com tampa de rosca. No tubo de ensaio contendo o meio de glicose colocou-se um tubo de Durham para a pesquisa de produção de gás. As leituras foram feitas com 7 e 14 dias, sendo que a utilização dos carboidratos foi constatada pela turvação e mudança da cor do meio de púrpura para o amarelo. As cepas controle empregadas para a fermentação da glicose foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. sphaericus* ATCC 14577 (negativo). Para a fermentação da arabinose, xilose e manitol, as cepas controle utilizadas foram o *B. polymyxa* ATCC 842 (positivo) e o *B. sphaericus* ATCC 14577 (negativo).

3.3.4 – Hidrólise da Caseína

Foram utilizados os Meios A e B, conforme Gordon et al (1973). A fórmula em g/L: Meio A – Skim milk (Difco) – 5; Água destilada q.s.p. 50mL e o Meio B – Ágar-ágar – 14; Água destilada q.s.p. 50mL. A esterilização era realizada separadamente para cada meio em autoclave a 120°C por 15 minutos. Resfriava-se a 45°C e misturava-se o meio A com B e seguindo a distribuição em placas de Petri (15x90mm). As placas permaneceram invertidas em estufa a 33°C até a secagem da superfície por 72 horas.

As placas foram inoculadas com auxílio de uma alça contendo cultura vinda de crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente. As placas inoculadas foram incubadas a temperatura de 33°C por 24 horas. A hidrólise da caseína (reação positiva) foi observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia. As cepas controle empregadas foram o *B. megaterium* ATCC 14581 (positivo) e o *B. macerans* ATCC 8244 (negativo).

3.3.5 – Utilização do Citrato de Sódio

O meio utilizado para testar a utilização do citrato de sódio foi Ágar Citrato de Christensen, na fórmula descrita por Claus & Berkeley (1986), em g/L ou mL/L: Extrato de lêvedo – 0,5; Citrato de sódio – 3,8; Glicose – 0,2; Cloreto de L(+) Cisteína – 0,1; Fosfato de Potássio Dibásico – 1,0; NaCl – 5,0; Vermelho de fenol 0,04% – 0,02; Ágar-ágar – 12,0 – Água destilada q.s.p.; pH 6,6 – 6,8, ajustado com solução de NaOH 1N. Após fusão e resfriamento a 45°C eram

distribuídos 3mL por tubos de ensaio de 15x150mm com tampa de rosca afrouxada. Após a esterilização em autoclave a 120°C, por 20 minutos, permaneciam inclinados até o resfriamento.

A inoculação de cada linhagem foi realizada com auxílio de uma alça contendo cultura vinda de crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente e incubado na temperatura de 33°C por 24 horas a 48 horas. A utilização do citrato (reação positiva) foi observada pela mudança de cor do meio, do amarelo para a coloração rósea-intenso. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. macerans* ATCC 8244 (negativo).

3.3.6 – Hidrólise da Esculina

O meio utilizado foi descrito por Cowan & Steel, (1974) e a fórmula por g/L: Peptona – 10; Citrato de ferro amoniacal – 1,0; Esculina – 1,0; Ágar-ágar – 20; Água destilada q.s.p.; pH 7,4, ajustado com solução de NaOH 1N. Após fusão era resfriado a 45°C sendo distribuído 3mL por tubos de ensaio de 15x150mm com tampa de rosca afrouxada. Após a esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, eram inclinados até o resfriamento.

A inoculação de cada linhagem foi realizada com auxílio de uma alça contendo cultura vinda de crescimento de 24 horas, em Caldo Nutriente, e incubada à temperatura de 33°C por 24 horas a 48 horas. A hidrólise da esculina (reação positiva) foi observada pela mudança de cor do meio, do marrom para o negro. A cepa controle empregada foi o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo).

3.3.7 – Redução do Nitrato a Nitrito

As linhagens em estudo foram cultivadas no meio Caldo Nitrato (Difco), conforme recomendado por Gordon et al (1973) e a fórmula em g/L é: Peptona de carne – 5; Extrato de carne – 3; Nitrato de potássio – 1; Água destilada q.s.p.; pH 7,0, ajustado com solução de NaOH 1N. Distribuíam-se 3 mL em tubos de ensaio com 15x150mm e tampa de rosca. A esterilização foi em autoclave a 120°C por 20 minutos.

A inoculação de cada linhagem (em triplicata) foi realizada com auxílio de uma alça contendo cultura vinda de crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente e incubada a temperatura de 33°C por 3, 7 e 14 dias. Ao término de cada período, adicionava-se para cada 1 mL de cultura 0,15 mL de uma das seguintes soluções: Solução 1, em g/L: Ácido sulfanílico – 8; Ácido acético glacial 5N q.s.p.e Solução 2, em g/L: Dimetil-alfa-naftilamina – 5; Ácido acético glacial 5N q.s.p.

O aparecimento de uma coloração vermelha intensa confirmava a presença de nitrito produzido pela redução do nitrato. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. megaterium* ATCC 14581 (negativo).

3.3.8 – Produção de Acetil-Metil-Carbinol

O teste de Voges-Proskauer (VP), para a detecção da produção de acetoína, foi realizado segundo Gordon et al (1973) e Claus & Berkeley (1986). Fórmula do meio em g/L: Proteose-Peptona (Difco) – 7; Glicose – 5; Cloreto de sódio – 5; Água destilada q.s.p. O pH era ajustado para 6,7 com solução de NaOH 1N. Esterilizava-se em autoclave a 120°C por 20 minutos.

As culturas em triplicata foram incubadas por 3, 5 e 7 dias a temperatura de 33°C. A pesquisa do pH no meio de VP foi feita com 3 dias, adicionando 2 a 3 gotas do indicador Vermelho de metila. Se a coloração resultasse vermelha, indicava que o pH era < 6; se permanecesse amarela, o pH estaria acima de 6,3. Antes que as culturas incubadas por 5 e 7 dias fossem testadas para presença de acetoína, determinava-se o pH com papel indicador; e em seguida eram adicionados 3 mL de NaOH 40% e 0,5 mg de creatina. A presença de acetoína (reação positiva) era observada pela produção de um halo vermelho na superfície do tubo após 30-60 minutos. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. megaterium* ATCC 14581 (negativo).

3.3.9 – Produção da Lecitinase

Formulado de acordo com Vasconcellos & Rabinovitch (1994). O meio continha em g/L: Triptona (Difco) – 10; Tris-(hidroximetil)aminometano – 1,21; Cloreto de sódio – 5; MgSO₄.7H₂O – 0,2; Resazurina – 0,01; Ágar-ágar – 20; Água destilada 950 mL, pH 7,2 ± 0,2. Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 20 minutos, resfriou-se o meio até 45°C, e adicionou-se assepticamente 50 mL de gema de ovo estéril (Difco), seguindo-se homogeneização sendo após vertidos 13 mL da mistura em placas de Petri (15x90mm).

As placas foram inoculadas com 10 µL de cultivo, de cada cepa, e observadas após a incubação a 30°C por 24 horas. A hidrólise da lecitina aparece sob a forma de um halo turvo contornando as colônias, podendo ser levemente corado em rosa, em contraste com o restante do

meio de cultura que permanece com a cor rosa mais intensa. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. megaterium* ATCC 14581 (negativo).

3.3.10 – Produção de Catalase

A pesquisa foi feita de acordo com Gordon et al (1973) e Claus & Berkeley(1986). Uma pequena quantidade de cultivo bacteriano em Ágar Nutriente foi retirada com alça, sendo depositada em uma lâmina de vidro. Adicionaram-se duas gotas de peróxido de hidrogênio a 10%. O desprendimento de gás, em virtude da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, era devido à ação da catalase. A cepa controle empregada foi o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo).

3.3.11 – Liquefação da Gelatina

A pesquisa da hidrólise da gelatina foi realizada de acordo com Claus & Berkeley (1986). A fórmula em g/L: Peptona de carne – 5; Extrato de carne – 3; Gelatina – 120; Água destilada q.s.p. O pH foi ajustado para $6,8 \pm 0,1$ com solução de NaOH 1N. Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 20 minutos.

A inoculação de cada linhagem foi realizada com auxílio de uma alça contendo cultura vinda de crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente e incubado a temperatura de 33°C durante 24 horas. Após este período, os tubos inoculados foram retirados da estufa e transferidos para a geladeira por 20 minutos. A hidrólise da gelatina (reação positiva) foi observada se o meio estivesse liquefeito, caso o meio estivesse consistente, considerava-se como reação negativa. As cepas controle empregadas foram o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo) e o *B. coagulans* ATCC 7050 (negativo).

3.3.12 – Ágar-Sangue com Produção de Hemólise

Adicionou-se 5% de sangue desfibrinado de carneiro ao Ágar BHI (Brain Heart Infusion – Difco), pH 7,4 e manteve-se a temperatura de 45-50°C. Homogeneizou-se e distribuiu-se em placas de Petri (15x90mm). A atividade hemolítica foi pesquisada a partir de semeadura por

depósito de 10 µL do crescimento das culturas bacterianas sobre a superfície da placa contendo Ágar Sangue. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas, e observou-se a existência de atividade hemolítica, indicada por uma zona de hemólise completa de 2 – 4mm de diâmetro (β -hemólise), ao redor do crescimento bacteriano. A cepa controle empregada foi o *B. cereus* NCTC 2599 (positivo).

3.3.13 – Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio

Tubos com Caldo Nutriente contendo 0, 5, 7 e 10% (p/v) de Cloreto de sódio foram inoculados com auxílio de uma alça contendo cultura vinda de crescimento de 24 horas em Caldo Nutriente e incubado à temperatura de 33°C durante 24 horas. O crescimento nas várias concentrações de NaCl foi observado em 7 e 14 dias. Para o crescimento de cloreto de sódio a 5, 7 e 10%, as cepas controle empregadas foram o *B. licheniformis* NCTC 10341 (positivo) e o *B. macerans* ATCC 8244 (negativo).

3.3.14 – Produção do Indol

Tubos, em duplicata, contendo Caldo Triptona a 1% foram inoculados e incubados a 30°C durante 5 e 14 dias. Após este período, adicionaram-se 2mL do Reativo de Kovacs (Álcool amílico – 75mL; Ácido clorídrico concentrado – 25mL; p-Dimetilaminobenzaldeído – 5g) em cada tubo inoculado. Após agitação observou-se o aparecimento de cor na camada alcoólica: vermelha indicava resultado positivo e amarelo, resultado negativo. As cepas controle empregadas foram o *B. alvei* ATCC 6344 (positivo) e o *B. cereus* NCTC 2599 (negativo).

3.3.15 – Caldo Nutriente

Fórmula em g/L: Peptona de carne – 5; Extrato de carne – 3; Água destilada q.s.p. e pH 6,8 \pm 0,1. Esterilizava-se em autoclave a 120°C por 20 minutos.

3.3.16 – Ágar Nutriente

Formulado como item 3.3.15 acrescido de 20g/L de Ágar-ágar.

3.4 – Avaliação Qualitativa da Atividade Biológica

As linhagens de *B. thuringiensis* autoaglutinantes foram crescidas em Ágar Nutriente por 48 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram, então, suspensas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%). Alíquotas de 1mL da suspensão bacteriana com uma densidade óptica igual a 0,1 e comprimento de onda ajustado para 600nm, foi adicionado em 50 mL de água destilada, contida em copos plásticos descartáveis contendo 15 larvas de 3º estágio jovens de *Aedes aegypti* ou *Culex quinquefasciatus*, seguindo-se incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Como referência de toxicidade foram usadas suspensões das linhagens de *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 (LFB-FIOCRUZ 584) e do *B. sphaericus* 2362 (LFB-FIOCRUZ 736) que foram tomadas neste estudo como padrões e, também, como controle positivo para cada uma das espécies de larvas, respectivamente *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Todas as linhagens foram testadas em duplicata e as larvas que não receberam suspensões bacterianas prestaram-se como controle negativo.

As mortalidades foram registradas 24 horas pós-tratamento em larvas de *Ae. aegypti* e 48 horas pós-tratamento em larvas de *Cx. quinquefasciatus*. O parâmetro de avaliação da atividade biológica foi considerado conforme Oliveira et al (1998), de acordo com a seguinte classificação:

- 0% a 20% de mortalidade larval igual a baixa toxicidade,
- 21% a 50% de mortalidade larval igual a média toxicidade,
- > 50% de mortalidade larval igual a alta toxicidade.

3.5 – Susceptibilidade a Antimicrobianos

O perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos foi efetuado segundo o método de difusão dos antimicrobianos a partir de discos impregnados com quantidades conhecidas, segundo Bauer et al (1966) e N.C.C.L.S. (2003). Os antimicrobianos usados foram os seguintes: Ácido Nalidíxico, 30 μg (AN); Ampicilina, 10 μg (AP); Bacitracina, 10un. (BC); Cefalotina, 30 μg (CF); Cefoxitina, 30 μg (CT); Clindamicina, 2 μg (CL); Cloranfenicol, 30 μg (CO); Eritromicina, 15 μg (EL); Estreptomicina, 10 μg (ET); Fosfomicina, 50 μg (FO); Gentamicina, 10 μg (GN); Lincomicina, 2 μg (LN); Polimixina B, 300un. (PL); Penicilina G, 10un. (PN); Sulfonamidas, 300 μg (SF); Sulfazotrim, 25 μg (STF); Tetraciclina, 30 μg (TT); Kanamicina, 30 μg (KN);

Netilmicina, 30µg (NET); Rifampicina, 5µg (RD); Sulfametoxazol/trimetoprim, 25µg (SXT) e Vancomicina, 5µg (VA).

3.5.1 – Inoculação das Placas de Petri

A inoculação foi realizada a partir de culturas de 18 horas de crescimento a 33°C em Caldo BHI (Difco). As placas de Petri com 150mm de diâmetro contendo 60 mL de meio com profundidade de 4 mm de Ágar Müeller-Hinton estéril foram inoculadas com o auxílio de “swab” que foi mergulhado em tubo contendo o pré-inóculo. Retirava-se o líquido excedente do “swab” e aplicava-se o inóculo na placa, espalhando-o sobre a superfície inteira. Na superfície de cada placa de Petri inoculada colocavam-se 10 discos impregnados com antimicrobianos, em quantidades conhecidas, com auxílio de uma pinça estéril. Em seguida, as placas de Petri inoculadas foram depositadas em estufa a 33°C. Após 24 horas foi efetuada a leitura das zonas de inibição, com auxílio de um halômetro (régua em milímetros).

3.5.2 – Interpretações dos Resultados

As medidas dos halos de resistência foram comparadas com as medidas padrão (N.C.C.L.S., 2003), para cada antimicrobiano testado (Quadro 1).

Quadro 1: Parâmetros para interpretação dos diâmetros dos halos de inibição nos antibiogramas.

Antimicrobianos*	Abreviaturas	Concentração dos Discos	Resistência (mm)	Sensibilidade (mm)
Ácido Nalidíxico	AN	30µg	≤ 18	≥ 19
Ampicilina	AP	10µg	≤ 18	≥ 19
Bacitracina	BC	10U	≤ 12	≥ 13
Cefalotina	CF	30µg	≤ 17	≥ 18
Cefoxitina	CT	30µg	≤ 17	≥ 18
Clindamicina	CL	2µg	≤ 16	≥ 17
Cloranfenicol	CO	10µg	≤ 17	≥ 18

Eritromicina	EL	15µg	≤ 17	≥ 18
Estreptomicina	ET	10µg	≤ 14	≥ 15
Fosfomicina	FO	50µg	≤ 14	≥ 15
Gentamicina	GN	10µg	≤ 14	≥ 15
Lincomicina	LN	2µg	≤ 16	≥ 17
Polimixina B	PL	300U	≤ 11	≥ 12
Penicilina G	PN	10U	≤ 21	≥ 22
Sulfonamida	SF	300µg	≤ 16	≥ 17
Sulfazotrim	STF	25µg	≤ 17	≥ 18
Tetraciclina	TT	30µg	≤ 18	≥ 19
Kanamicina	KN	30µg	≤ 17	≥ 18
Netilmicina	NET	30µg	≤ 14	≥ 15
Rifampicina	RD	5µg	≤ 24	≥ 25
Sulfametoxazol/trimetoprim	SXT	25µg	≤ 10	≥ 11
Vancomicina	VA	5µg	≤ 17	≥ 18

Legenda:

* Todos os discos de antibióticos e quimioterápicos foram fornecidos pelo Laboratório Cecon, com exceção da Netilmicina, Rifampicina, Sulfametoxazol/trimetoprima e Vancomicina procedente do Laboratório OXOID.

3.6 – Eletroforese de Proteínas dos Cristais de Protoxinas

Para a realização desta caracterização, foi utilizada a análise do perfil protéico dos cristais produzidos pelas linhagens em estudo. Esta análise foi feita através da eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio/ SDS-PAGE a 12%, como descrito por Laemmli & Favre (1973).

Esta técnica está fundamentada na separação de moléculas de acordo com o seu peso molecular em um meio-suporte de gel de poliacrilamida e de tampões com pH adequados, sob a influência de um campo elétrico. Os géis de poliacrilamida são utilizados para a separação de proteínas ou moléculas pequenas de ácidos nucleicos, sendo portanto útil para estimar o peso molecular dos polipeptídeos.

Para a obtenção das proteínas dos cristais de protoxinas, as cepas bacterianas foram crescidas em Caldo Simples (Extrato de carne-5g/L; Peptona de carne-10g/L e NaCl-5g/L), numa

temperatura de $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e agitação em “Incubator Shaker” a 175 rpm, durante um período de 48 horas. Posteriormente, cada linhagem foi centrifugada em “Labofuge 400R” à 5.000 rpm, a 10°C durante 20 minutos. Em seguida, o resíduo foi ressuspensão em 1mL de água destilada estéril, e 75 μL deste resíduo foram adicionados em 25 μL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; SDS 10%; β -mercaptoetanol 4%; Glicerol 8%; Azul de bromofenol 0,1%) e aquecidos a 100°C por 10 minutos (Lecadet et al, 1992).

O extrato com as proteínas solubilizadas, de cada cepa, foi centrifugado (10.000 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante foi aplicado em gel de poliacrilamida a 12% e, então, submetido à eletroforese. Ao término da corrida, o gel foi imerso imediatamente em solução fixadora preparada com metanol a 50% em água destilada (454mL) e ácido acético glacial (46mL), com leve agitação, durante 20 minutos. Em seguida, o gel foi transferido à solução corante (Coomassie Blue BB R-250 a 0,25% em solução fixadora), e submetido à leve agitação, por 10 minutos. O excesso do corante foi retirado do gel com inúmeras lavagens em solução descolorante (Metanol 50mL/L e Ácido acético glacial 75mL/L).

Posteriormente, o gel foi transferido à solução de secagem [Metanol a 50% em água destilada (454mL) e Glicerol 0,5%] durante 5 minutos e afixado em papel celofane também embebido na solução de secagem, sendo em seguida deixado à temperatura ambiente para secar .

Foram utilizados marcadores de peso molecular conhecidos, tais como: a miosina – 205 kDa; β -galactosidase -116 kDa; fosforilase B – 97,4 kDa; albumina sérica – 66 kDa; ovalbumina de ovo branco – 45 kDa e carbônico-anidrase – 29 kDa, para determinar o tamanho das moléculas de proteínas das linhagens em estudo.

3.7 – Eletroforese de Multilocus Enzimáticos (MLEE)

Na eletroforese de isoenzimas em gel de agarose, a separação das moléculas de enzimas se fundamenta na diferença da carga iônica entre as moléculas protéicas e a velocidade de deslocamento no suporte, por estes serem extremamente porosos, o que colabora para migrações protéicas diferenciadas. A velocidade de migração das proteínas está relacionada com o tamanho da carga elétrica na molécula enzimática, aplicada no campo elétrico pelos eletrodos. A principal função do tampão é de manter o pH constante uma vez que durante a eletroforese, ácidos são produzidos no anodo e bases são geradas no catodo.

3.7.1 – Procedimento Experimental

3.7.1.1 – Crescimento e Lise Celular

As cepas bacterianas a serem submetidas à eletroforese foram cultivadas em Ágar BHI (Brain Heart Infusion – Difco), pH 7,4 a 33°C. Com 18 horas, quando as células bacterianas ainda encontravam-se na fase vegetativa de crescimento, era retirada uma alça cheia de cada cultura a qual era suspensa em 400µL de tampão de lise (Triton X-100 1%; 0,1M Tampão Tris pH 8,0; EDTA 0,001M; DDT 0,001M e ácido ε-p-amino-n-capróico 13%). Cerca de 30mg de pérolas de vidro com 0,5mm de diâmetro eram adicionadas a cada amostra, que então era homogeneizada em agitador magnético durante 1 min. Desta forma foi realizado um processo de lise químico e físico das células bacterianas. O material lisado foi então mantido a 0°C. As células lisadas e congeladas foram utilizadas e reutilizadas até três vezes para as corridas eletroforéticas (Zahner et al, 1989,1992).

3.7.1.2 – Técnica de Eletroforese de Isoenzimas (Eletroforese de Multilocus Enzimáticos – MLEE)

Para elaboração do gel de agarose a ser utilizado na corrida de eletroforese, foi preparada uma solução de Agarose a 1% (p/v) em tampão apropriado para cada enzima na proporção de 1:2. Este conjunto foi fundido e aproximadamente cerca de 70mL desta solução foram derramadas numa película plástica específica (“Gel Bond”), colocada sobre uma placa nivelada. Após a gelificação sobre o suporte, o gel foi acondicionado em geladeira por no mínimo 18 horas e no máximo 48 horas. Para a sua utilização o gel foi coberto com papel de filtro para secagem antes da aplicação dos lisados de células, o que permitia uma melhor absorção. Para a aplicação das amostras foi colocada uma fita plástica com 24 orifícios equidistantes.

Posteriormente, foram aplicados 10µL de cada lisado nos orifícios da fita sobre o gel, esperou-se secar para que os lisados fossem absorvidos e em três orifícios aplicaram-se junto com o lisado 5 µL de um composto de corantes (Azul de bromofenol, 34mg; Xilenocianol, 28mg; Água destilada, 10mL) utilizado como marcador de corrida, para facilitar a visualização e

controle da velocidade e o término da corrida. Em seguida, este gel foi depositado em uma cuba de eletroforese horizontal “Multiphor II System”, a temperatura constante de 10°C, mantida por um circulador de água resfriada “Multitemp II”. As duas câmaras, do catodo e do anodo, da cuba de eletroforese, foram preenchidas com dois litros cada com tampão apropriado para cada enzima a ser testada (Quadro 2). As amostras foram colocadas no catodo e a migração procedeu-se para o anodo, tendo a maioria das enzimas testadas, sob as condições experimentais, carga negativa. A fonte de energia foi mantida com voltagem constante dependendo do tampão utilizado e da enzima a ser revelada (Zahner et al, 1989,1994).

Quadro 2: Soluções tampões empregadas na técnica da eletroforese de isoenzimas (MLEE).

Solução Tampão	Fórmula	g/L	Tampão número (*)
Tris maléico pH 7,4	Ácido maléico	5,0	1
	Trizma	12,11	
	Na ₂ EDTA	0,37	
	MgCl ₂ (anidro)	0,095	
Fosfato pH 8,0	Na ₂ HPO ₄ .7 H ₂ O	51,45	2
	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	1,105	
Tris citrato pH 8,1	Trizma	41,6	3
	Ácido cítrico	16,5	

Legenda:

(*) = Numeração para correlacionar com os dados do Quadro 3.

3.7.1.3 – Revelação das Isoenzimas

Ao término da corrida eletroforética, o gel foi removido da cuba e imerso na solução de revelação específica para cada enzima e em seguida incubado a 37°C. O tempo dependia de observação constante para determinar o melhor momento à interrupção das reações enzimáticas para visualização das bandas. A interrupção foi feita adicionando-se ao gel uma solução de ácido acético a 5% (v/v). Inúmeras trocas da solução foram realizadas a fim de remover o material não precipitado.

Os procedimentos histoquímicos envolvidos na revelação/coloração de cada enzima se baseiam na propriedade catalítica das mesmas e, estas quando em contato com os substratos específicos além de outras substâncias químicas (co-fatores, enzimas de ligação, íons, etc), necessárias para suas atividades, transformam o substrato em produto. Quando um dos componentes da reação enzimática é corado, pode-se visualizar a posição da banda no gel de agarose.

Neste estudo, 10 sistemas enzimáticos foram testados, a fim de se obter a revelação das seguintes enzimas: Malato desidrogenase, MDH (E.C. 1.1.1.37); Enzima Málica, ME (E.C. 1.1.1.40); Alanina desidrogenase, ALDH (E.C. 1.4.1.1); Leucina desidrogenase, LDH (E.C. 5.3.1.8); Nucleosídeo fosforilase, NP (E.C. 2.4.2.1); Fosfoglucose isomerase, GPI (E.C. 5.3.1.9); Esterase, EST (E.C. 3.1.1.1); Peptidase 3, PEP3 (E.C. 1.1.1.4); Peptidase 2, PEP2 (E.C. 3.4.11.1) e Peptidase D, PEPD (E.C. 3.4.13.9).

As soluções específicas utilizadas à revelação de cada enzima estão especificadas no Quadro 3, segundo preconizado por Selander et al (1986).

3.7.1.4 – Interpretação dos Géis

Após a secagem em temperatura ambiente, o gel era analisado. Cada banda revelada no gel foi chamada de eletromorfo. Os eletromorfos foram numerados de acordo com sua mobilidade anódica. Cada eletromorfo foi numerado em ordem crescente, sendo que a banda mais próxima do catodo foi designada como variante 1, a posterior recebia o número 2 e assim sucessivamente. Após esta padronização, as cepas que apresentavam uma determinada banda em uma enzima específica eram utilizadas para confirmar ou determinar o perfil de outras cepas, pois, sabe-se que, num estudo em que várias enzimas são testadas, as amostras que apresentam o mesmo padrão isoenzimático, isto é, quando têm os mesmos eletromorfos para cada enzima, pertencem ao mesmo tipo eletroforético (TE) (Selander et al, 1986).

Quadro 3: Sistemas de revelação das enzimas empregadas na técnica da eletroforese de isoenzimas (MLEE).

Enzimas	Tampão da reação Tris HCl	H ₂ O	Substratos 200mg/10mL	Coenzimas 400mg/mL	Ativadores 4g/10mL	Enzima de Ligação	Método de Visualização	Tampão do Eletrodo (*)
ALDH E.C.1.4.1.1	4 mL pH 8,0	---	100mg alanina	1 mL NAD	---	---	2,0 mL MTT 1,0 mL PMS	2
EST E.C.3.1.1.1	10 mL pH 7,4	40 mL	25mg α -naftil- acetato	---	---	---	25mg Fast Blue RR	2
GPI E.C.5.3.1.9	4 mL pH 8,0	1 mL	1 mL frutose- 6-fosfato	1 mL NADP	200 μ L MgCl ₂	10 μ L G6PDH	2,0 mL MTT 1,0 mL PMS	2
LDH E.C.5.3.1.8	4 mL pH 7,4	---	300mg leucina	3 mL NAD	---	---	2,0 mL MTT 1,0 mL PMS	1
MDH E.C.1.1.1.37	4 mL pH 8,0	---	1 mL de malato de sódio	2 mL NAD	---	---	2,0 mL MTT 1,0 mL PMS	1
ME E.C.1.1.1.40	4 mL pH 7,4	1 mL	1 mL de malato de sódio	1 mL NADP	200 μ L MgCl ₂	---	2,0 mL MTT 1,0 mL PMS	1
NP E.C.3.2.2.1	4 mL pH 7,4	3 mL	30mg inosina	--	---	10 μ L xantina oxidase	2,0 mL MTT 1,0 mL PMS	2
PEP D E.C.3.4.13.9	4 mL pH 7,4	5 mL	10mg L- leucil-prolina	---	20mg MnCl ₂	2mg amino oxidase 100 μ L peroxidase	10mg 3- amino-9-etil- carbazole	3

PEP 2 E.C.3.4.11.1	4 mL pH 7,4	5 mL	10mg L- leucil-prolina	---	20mg MnCl ₂	2mg amino oxidase 100µL peroxidase	10mg 3- amino-9-etil- carbazole	3
PEP 3 E.C.1.1.1.40	4 mL pH 7,4	5 mL	10mg L- leucil-prolina	---	20mg MnCl ₂	2mg amino oxidase 100µL peroxidase	10mg 3- amino-9-etil- carbazole	3

Legenda: (*) = Os tampões do eletrodo apropriados a cada enzima encontram-se listados no Quadro 2.

3.8 – Estudos Genéticos de *Bacillus thuringiensis*

3.8.1 – Extração de DNA

A extração do DNA seguiu a metodologia usada por Harwood et al (1990) citado em Santos (2000).

Para obtenção do DNA cromossomal de cada linhagem autoaglutinantes de *B. thuringiensis*, as estirpes foram inoculadas em 3mL de Caldo Luria-Bertani (Bacto-triptona - 10g/L, Extrato de levedo - 5g/L, Cloreto de sódio – 10g/L pH 7,2) a $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 130 rpm por 4 horas. Desse pré-inóculo foram retirados 100 μL e inoculados em 10mL de Caldo Luria-Bertani sendo incubados nas mesmas condições do pré-inóculo por 24 horas.

As células foram recolhidas do meio de cultivo por centrifugação a 5.000 rpm por 20 minutos a 10°C . O resíduo resultante foi ressuspensão em 1mL da solução tampão (10mM Tris-HCl pH 7,0; 10mM EDTA pH 8,0; 300mM NaCl). Em seguida, o sedimento de cada amostra foi centrifugado durante 5 minutos a 13.000 rpm e 10°C . Após o descarte do sobrenadante, foram acrescentados 300 μL da solução tampão, sendo homogeneizado em agitador magnético. A seguir, foram adicionados 150 μL de solução de Lisozima (20mg/mL), e homogeneizado por inversão (\pm 15 vezes) e resfriado em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi aquecido em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após retirar do banho-maria, foram adicionados 25 μL de Lauril sarcosil (30%), homogeneizando-se delicadamente e aquecendo em banho-maria a 65°C por 28 minutos. A seguir, deixava-se descansar por 10 minutos em gelo.

Seguiu-se o tratamento com fenol-clorofórmio (v/v), com homogeneização em agitador magnético até aparência leitosa. Em seguida, centrifugava-se por 6 minutos, 13.000 rpm, a 10°C . Passou-se à recuperação da fase superior e posterior tratamento com clorofórmio 1:1 com homogeneização em agitador magnético. Após a centrifugação (13.000 rpm por 5 minutos a 10°C), seguiu a recuperação da fase superior pela centrifugação e posterior tratamento com 2,5X de álcool etílico gelado (v/v) e 10 μL de acetato de sódio 3M (pH 7,0). A homogeneização foi feita por inversão dos tubos suavemente. Os tubos foram depositados em freezer ($- 20^{\circ}\text{C}$) para precipitar até o dia seguinte.

Após 24 horas, esses tubos foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e 10°C . Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 500 μL de etanol a 70% gelado, centrifugando-se por mais

5 minutos a 10.000 rpm e 10°C. O sobrenadante foi desprezado e colocava-se os tubos contendo o DNA extraído na capela química com exaustão por 1 hora para evaporação do etanol.. O material extraído foi ressuspensão em 120µL de água bidestilada estéril e posteriormente homogeneizado e tratado com 1µL de RNase (30mg/mL) e aquecido em banho-maria a 37°C por 1 hora. Ao final desse período, o material extraído foi estocado em freezer (- 20°C) para uso posterior.

3.8.1 - Dosagem do DNA

Após a extração, a concentração de DNA foi determinada conforme Sambrook et al (1989). As amostras de DNA de concentrações desconhecidas foram aplicadas em gel de agarose 1% em Tris-borato EDTA (TBE) (Tris-borato 89mM; EDTA 2mM pH 8,0), juntamente com padrões de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5µg/mL, em água destilada, durante 10min. A intensidade de fluorescência das amostras foi estimada por comparação com o padrão Lambda (λ), onde 1µL equivale a 55ng. Em seguida, o material extraído da cepa de referência (LFB-FIOCRUZ 584) foi diluído nas seguintes concentrações: 1:10 e 1:50. Os resultados das amplificações da cepa de referência feitas com o kit “Ready to Go RAPD Analysis Beads”, utilizando o iniciador nº1 demonstraram resultados idênticos às duas concentrações de DNA utilizadas. Desse modo optou-se por trabalhar com a diluição 1:50 já que o perfil de bandas foi idêntico nas duas diluições.

3.8.2 - Condições de Amplificação para Análise do RAPD-PCR

Para os ensaios foi utilizado um kit da Amersham Pharmacia Biotech denominado “Ready to Go RAPD Analysis Beads”.

A metodologia usada nesta reação, bem como os ciclos para RAPD-PCR seguiram as recomendações do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25µL contendo: 18µL de água destilada estéril, 5µL do iniciador (25pmol) e 2µL de DNA “template” (5-50ng). Como controle positivo do kit foi usado *E. coli* BL21 DNA e um controle negativo, isento de DNA.

A reação de amplificação envolveu 45 ciclos de 95°C por 1 min, 36°C por 1 min e 72°C por 2 min para a desnaturação, anelamento e extensão do iniciador, respectivamente. Todas as amostras do RAPD-PCR foram submetidas a uma pré-amplificação por 5 min a 95°C e uma pós-amplificação por 7 min a 72°C.

3.8.3 - Oligonucleotídeos Iniciadores

No presente estudo, os iniciadores utilizados fazem parte do kit “Ready to Go RAPD Analysis Band”. Cada iniciador é uma seqüência arbitrária de 10 pares de base na concentração de 2,5nmol. As seqüências dos iniciadores utilizados para a realização da reação de amplificação acima descrita encontram-se no Quadro 4:

Quadro 4: Seqüências dos iniciadores utilizados na técnica de amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR).

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')
1	(5'-d [GGTGCGGGAA]-3')
2	(5'-d [GTTTCGCTCC]-3')
3	(5'-d [GTAGACCCGT]-3')
4	(5'-d [AAGAGCCCGT]-3')
5	(5'-d [AACGCGCAAC]-3')
6	(5'-d [CCCGTCAGCA]-3')

3.8.4 – Condições de Eletroforese para os Produtos Amplificados por RAPD-PCR

Os produtos da amplificação foram analisados pela separação de 5µL do produto amplificado e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em Tris-borato EDTA (TBE 1X) (Tris-borato 89mM; EDTA 2mM pH 8,0) a 75V, por 3 horas e visualizados sob a luz ultra-violeta, após tratamento por 15 min com brometo de etídio na concentração de 0,5µg/mL. Um peso molecular de 100pb de DNA da “Amersham Pharmacia Biotech” foi usado como referência.

3.9 – Análise Numérica

Os resultados obtidos na susceptibilidade a antimicrobianos, na eletroforese de isoenzimas (MLEE) e na amplificação randômica de DNA polimórficos (RAPD-PCR), foram transformados em matrizes binárias sendo, assim, submetidos ao programa de análise numérica NTSYS-pc (versão 2.1) (Rohlf, 2002).

A análise dos perfis obtidos entre as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* foram realizadas com base no cálculo de Coeficiente de Concordância Simples, onde se obteve a matriz de similaridade entre as estirpes.

O Coeficiente de Concordância Simples é expresso através da seguinte fórmula $SSM = \frac{a+d}{a+b+c+d}$, onde numa comparação entre dois indivíduos (X) e (Y), a = número de caracteres coincidentemente positivos entre dois indivíduos em análise; b = número de caracteres presentes em (X) e ausentes em (Y); c = número de caracteres presentes em (Y) e ausentes em (X) e d = número de caracteres ausentes nos dois indivíduos em estudo.

Com o uso do Coeficiente de Concordância Simples, estabeleceu-se a matriz de similaridade. Essa matriz foi transformada em fenograma pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA) segundo Rohlf (2002).

4 – RESULTADOS

4.1 – Avaliação Qualitativa da Atividade Biológica, Citomorfologia, Fisiologia e Bioquímica

Nos bioensaios qualitativos realizados, as 26 estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* apresentaram alta toxicidade (mortalidade larval $\geq 50\%$) contra larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Já as estirpes LFB-FIOCRUZ 853 e 1070 demonstraram baixa toxicidade (mortalidade larval de 0% a 20%) para os insetos-vetores em estudo (Tabela 2).

Os perfis bioquímico, fisiológico e citomorfológico das estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* mostraram que os novos isolados apresentaram, em sua maioria, parâmetros característicos para a espécie em estudo, de acordo com Gordon et al (1973); Cowan & Steel, (1974); Claus & Berkeley (1986) e Vasconcellos & Rabinovitch (1994). Pequenas variações foram encontradas no comprimento das células, observadas por microscopia óptica, no crescimento em Caldo Nutriente contendo NaCl a 5% e 7%, na formação do Acetil-metil-carbinol e na posição do esporo no esporângio, onde predominou a posição sub-terminal. Os resultados encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Resultados da citomorfologia e avaliação qualitativa da atividade biológica das estirpes autoaglutinantes de *Bacillus thuringiensis*.

Cepas	Tamanho das células		Esporos			Coloração	Mobilidade	Toxicidade para *	
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Forma	Deformação/ Esporângio	Posição	Gram		<i>Aedes</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
584	3,1	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
853	2,9	≥ 1	E	-	ST	+	+	-	-
859	3,2	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
894	3,6	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
897	3,4	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
907	3,5	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
966	3,6	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
968	3,7	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
969	3,6	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1028	3,8	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1035	3,7	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1036	2,9	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1037	3,4	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1038	3,7	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1039	3,4	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1041	3,8	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1042	3,2	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1043	2,8	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1044	3,8	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1061	3,4	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1062	3,4	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1067	3,6	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1068	3,7	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1070	2,9	≥ 1	E	-	ST	+	+	-	-
1071	3,6	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1072	3,5	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1073	3,4	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1074	3,7	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+
1076	3,5	≥ 1	E	-	ST	+	+	+	+

Legenda:

(+) = positivo (-) = negativo

E = elíptico ST = sub-terminal

*(+)= > 50% de mortalidade larval igual a alta toxicidade

*(-) = 0% a 20% de mortalidade larval igual a baixa toxicidade

Tabela 3: Resultados das provas bioquímicas e fisiológicas das estirpes autoaglutinantes de *Bacillus thuringiensis*.

LFB	584	853	859	894	897	907	966	968	969	1028	1035	1036	1037	1038	1039	1041	1042	1043	1044	1061	1062	1067	1068	1070	1071	1072	1073	1074	1076	
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CAS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ANI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LEC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ACE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 7%	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

... continuação da Tabela 3

HE M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AR A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XIL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MA N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLI c/ Gás	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

(+) = positivo (-) = negativo

CIT = Utilização do Citrato CAS = Hidrólise da Caseína GEL = Liquefação da Gelatina ANI = Hidrólise do Amido LEC = Produção da Lecitina

ESC = Hidrólise da Esculina CAT = Produção de Catalase ACE = Produção de Acetil-Metil Carbinol IND = Produção de Indol ANA = Crescimento Anaeróbico

NIT = Redução do Nitrato à Nitrito NaCl 5%, 7% e 10% = Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio HEM = Produção de Hemólise do tipo β

GLI = Fermentação da Glicose ARA = Fermentação da Arabinose XIL = Fermentação da Xilose MAN = Fermentação da Manitol

GLI c/ Gás = Fermentação da Glicose com Pesquisa de Produção de Gás

4.2 – Susceptibilidade a Antimicrobianos

No perfil de resistência a antimicrobianos, as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* foram 100% resistentes a seis deles: Penicilina G (PN); Lincomicina (LN); Polimixina B (PL); Rifampicina (RD); Bacitracina (BC) e Vancomicina (VA) e somente dois antimicrobianos, Netilmicina (NET) e Sulfametoxazole/Trimetroprim (SXT) demonstraram 100% de inibição para as estirpes estudadas (Tabela 4). Verifica-se, por exemplo, que estirpes isoladas da mesma fonte apresentaram números de antimicrobianos multi-resistente diferentes. A estirpe LFB-FIOCRUZ 1036 apresentou múltipla resistência a 18 antimicrobianos, enquanto que, as estirpes LFB-FIOCRUZ 1039 e 1041 demonstraram múltipla resistência para 7 antimicrobianos.

A Tabela 4, também apresenta os resultados de porcentagens de resistência e sensibilidade das estirpes autoaglutinantes aos antimicrobianos. As Figuras 12 e 13 representam, respectivamente, os fenogramas, resultantes da taxonomia numérica baseada no perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos das estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis*, para o qual se utilizou o coeficiente de concordância simples. No perfil de resistência o grupo A e B apresentaram 69% de afinidade entre as autoaglutinantes, com a presença de três grupos de estirpes com o mesmo perfil. Entre estes grupos, encontram-se linhagens isoladas de origens distintas, como por exemplo, as estirpes LFB-FIOCRUZ 1039, 1041 e 1076 que provêm de fontes diferentes, como larvas de *Simulium* sp. e solo úmido. Os dados registraram uma expressiva heterogeneidade entre as estirpes autoaglutinantes isoladas de diferentes nichos ecológicos.

Tabela 4: Perfil de resistência e sensibilidade das estirpes autoaglutinantes, bem como, a respectiva porcentagem de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos das estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

LFB FIOCRUZ	Antimicrobianos ¹																					
	AN	AP	BC	CF	CT	CL	CO	EL	ET	FO	GN	LN	PL	PN	SF	STF	TT	KN	NET	RD	SXT	VA
853	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R
859	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R
894	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R
897	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
907	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
966	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
968	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
969	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R
1028	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1035	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R
1036	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
1037	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1038	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
1039	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1041	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1042	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R
1043	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
1044	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R
1061	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1062	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
1067	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1068	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1070	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1071	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
1072	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
1073	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R

1074	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R
1076	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R
% R ²	42,8	85,7	100	85,7	78,6	17,8	17,8	35,7	17,8	78,6	3,6	100	100	100	10,7	17,8	39,3	25	0	100	0	100
% S ³	57,1	14,3	0	14,3	21,4	82,2	82,2	64,3	82,2	21,4	96,4	0	0	0	89,3	82,2	60,7	75	100	0	100	0

Legenda:

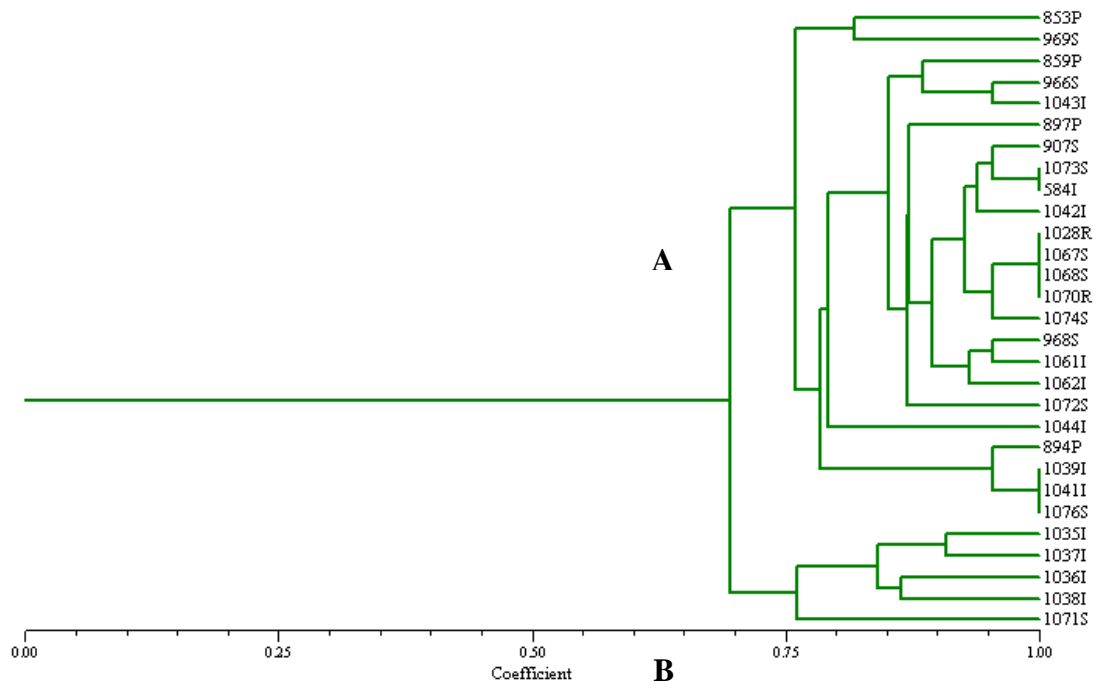
1 – Ácido Nalidíxico, 30µg (AN); Ampicilina, 10µg (AP); Bacitracina, 10un. (BC); Cefalotina, 30µg (CF); Cefoxitina, 30µg (CT); Clindamicina, 2µg (CL); Cloranfenicol, 30µg (CO); Eritromicina, 15µg (EL); Estreptomicina, 10µg (ET); Fosfomicina, 50µg (FO); Gentamicina, 10µg (GN); Lincomicina, 2µg (LN); Polimixina B, 300un. (PL); Penicilina G, 10un. (PN); Sulfonamidas, 300µg (SF); Sulfazotrim, 25µg (STF); Tetraciclina, 30µg (TT); Kanamicina, 30µg (KN); Netilmicina, 30µg (NET); Rifampicina, 5µg (RD); Sulfametoxazol/trimetoprima, 25µg (SXT) e Vancomicina, 5µg (VA).

2 - % R = Resistência, porcentagem para cada um dos antimicrobianos

3 - % S = Sensibilidade, porcentagem para cada um dos antimicrobianos

R = Resistência S = Sensibilidade

Perfil de Resistência aos Antimicrobianos
Coeficiente de Concordância Simples



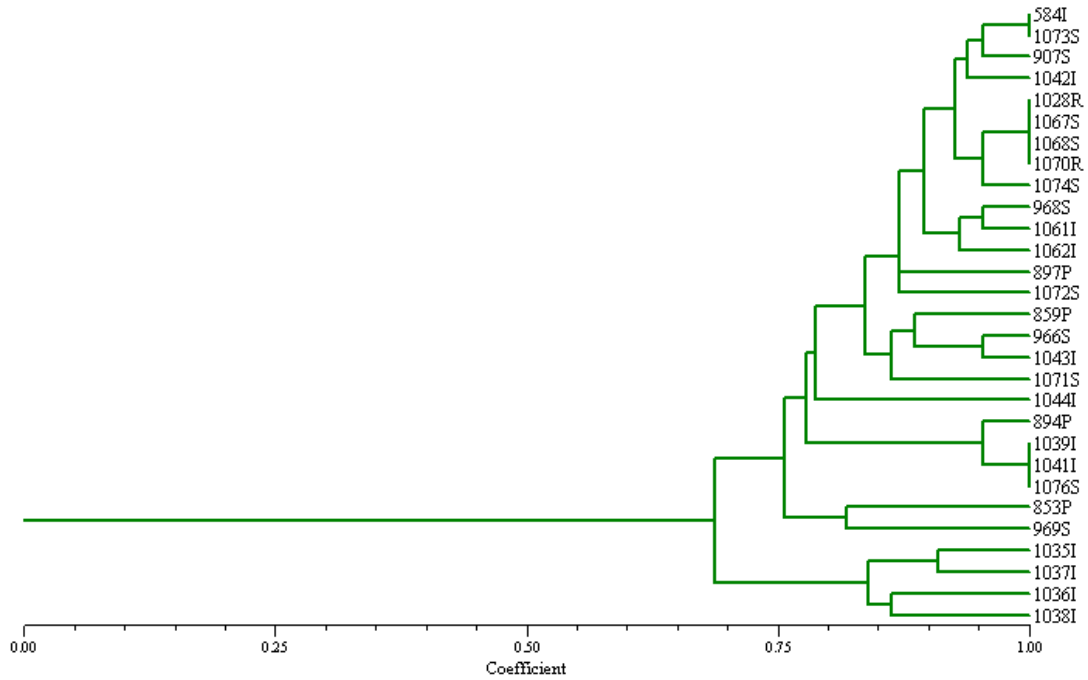
Legenda:

P = Condimentos S = Solos I = Insetos R = Rizosfera

Figura 12: Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise de resistência aos antimicrobianos de estipes de *Bacillus thuringiensis* autoaglutinantes.

□□□

Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos
Coeficiente de Concordância Simples



Legenda:

P = Condimentos S = Solos I = Insetos R = Rizosfera

Figura 13: Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise de sensibilidade aos antimicrobianos de estipes de *Bacillus thuringiensis* autoaglutinantes.

4.3 – Caracterização Protéica dos Cristais de Protoxinas

Os resultados obtidos através da análise das proteínas totais realizada por SDS-PAGE das estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* demonstraram a presença de cinco grupos distintos. No Grupo 1 incluiu-se as 23 estirpes *B. thuringiensis* autoaglutinantes mosquitocidas, que compartilharam o mesmo perfil protéico da linhagem *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 sorotipo flagelar H 14 (LFB-FIOCRUZ 584). Esses resultados estão ilustrados nas Figuras 14 e 15. No Grupo 2 foi formado pelas estirpes mosquitocidas LFB-FIOCRUZ 969 e 1038 que apresentaram um perfil de bandas protéicas comuns com a cepa de referência LFB-FIOCRUZ 584, porém com a presença de uma proteína com peso molecular de aproximadamente 55 kDa fato que encontra-se ilustrado nas Figuras 14 e 15. Com relação a estirpe mosquitocida LFB-FIOCRUZ 1043, que também apresentou um perfil de proteínas comuns ao da cepa de referência, demonstrou além disso, uma proteína de peso molecular de 100 kDa e, deste modo, foi incluída no Grupo 3 (Figura 14).

Já as estirpes LFB-FIOCRUZ 853 e 1070 possuem um perfil protéico diferente da cepa de referência LFB-FIOCRUZ 584, sendo que estas também, possuem perfis distintos entre si (Figura 16). Logo, cada isolado foi inserido em um grupo diferente. No Grupo 4 inclui a estirpe LFB-FIOCRUZ 853 com proteínas com peso molecular em torno de 100 kDa e 50-55 kDa. Já no Grupo 5 insere-se a estirpe LFB-FIOCRUZ 1070 com proteínas em torno de 140-135 kDa e 65 kDa.

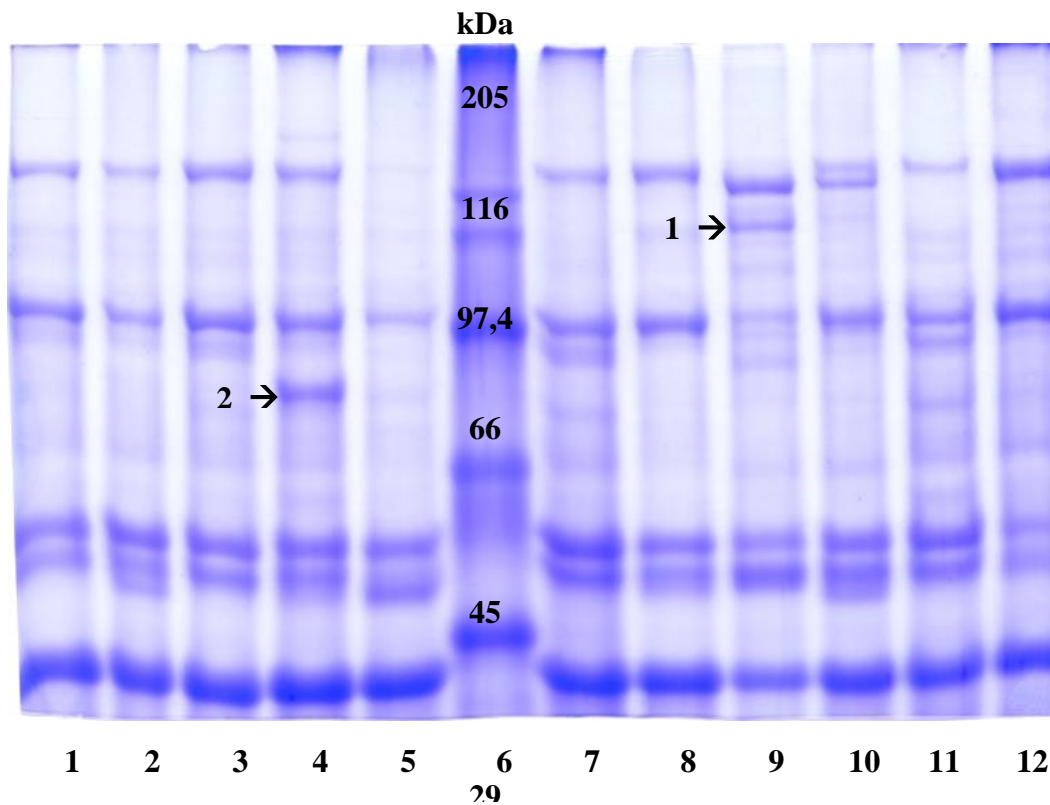


Figura 14: Perfil protéico de cristais de protoxinas das *Bacillus thuringiensis* autoaglutinantes mosquitocidas. Linha: **1**, LFB-FIOCRUZ 1035; **2**, LFB-FIOCRUZ 1036; **3**, LFB-FIOCRUZ 1037; **4**, LFB-FIOCRUZ 1038; **5**, LFB-FIOCRUZ 1039; **6**, Marcador de Peso Molecular - kDa; **7**, LFB-FIOCRUZ 1041; **8**, LFB-FIOCRUZ 1042; **9**, LFB-FIOCRUZ 1043; **10**, LFB-FIOCRUZ 1044; **11**, LFB-FIOCRUZ 1076; **12**, LFB-FIOCRUZ 584 (*B. thuringiensis* sorovar *israelensis* H:14). As setas 1 e 2 indicam as proteínas de pesos moleculares de aproximadamente 100kDa e 55kDa, respectivamente.

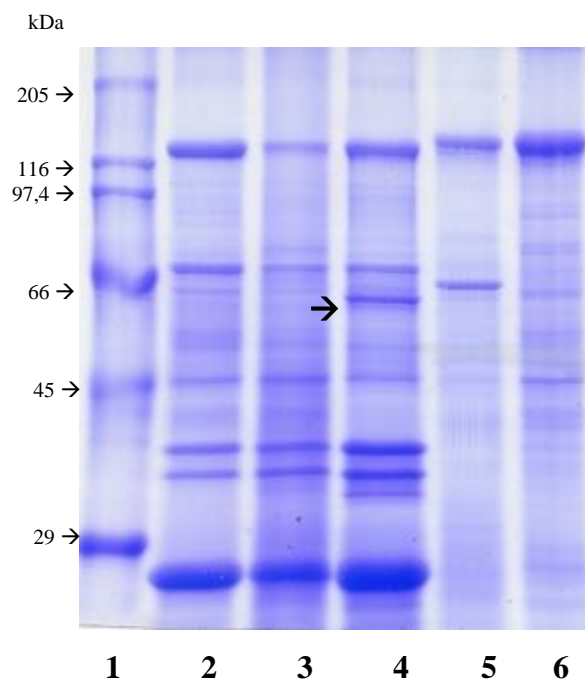


Figura 15: Perfil protéico das δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* autoaglutinantes. Linha: **1**, Marcador de Peso Molecular - kDa; **2**, LFB-FIOCRUZ 584 (*B. thuringiensis* sorovar *israelensis* H:14); **3**, LFB-FIOCRUZ 894; **4**, LFB-FIOCRUZ 969; **5**, LFB-FIOCRUZ 263 (*B. thuringiensis* sorovar *kurstaki*); **6**, LFB-FIOCRUZ (*B. thuringiensis* sorovar *morrisoni*). A seta indica a proteína de peso molecular de aproximadamente 55kDa.

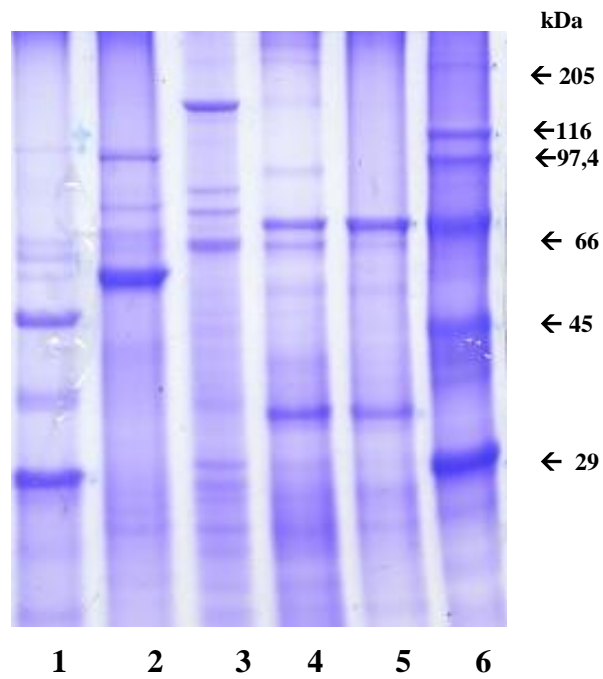


Figura 16: Perfil protéico das δ -endotoxinas das estirpes autoaglutinantes de *Bacillus thuringiensis* atóxicas. Linha: **1**, LFB-FIOCRUZ 869 (*B. thuringiensis* sorovar *brasiliensis*); **2**, LFB-FIOCRUZ 853; **3**, LFB-FIOCRUZ 1070; **4**, LFB-FIOCRUZ 1071; **5**, LFB-FIOCRUZ 1028; **6**, Marcador de Peso Molecular - kDa.

4.4 – Eletroforese de Multilocos Enzimáticos (MLEE)

Através da análise isoenzimática foram obtidos três tipos eletroforéticos (TEs) para as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis*. A Tabela 5 mostra que 26 estirpes autoaglutinantes apresentaram o mesmo tipo eletroforético da cepa de referência (LFB-FIOCRUZ 584) e portanto agruparam-se no TE1. Já as estirpes atóxicas LFB-FIOCRUZ 853 e 1070, com tipos eletroforéticos distintos da cepa de referência, foram agrupadas no TE2 e TE3, respectivamente. Estas estirpes diferenciaram-se em relação ao *locus* enzimático NP, porém, quando comparadas com o TE1, a estirpe LFB-FIOCRUZ 853 distinguiu-se nos *loci* enzimáticos ALDH, NP e EST e a estirpe LFB-FIOCRUZ 1070 diferencia-se nos *loci* enzimáticos ALDH e EST. Para os demais *loci* estudados, as estirpes autoaglutinantes foram monomórficas. A Figura 17 mostra o fenograma resultante da taxonomia numérica baseada nos dados da análise isoenzimática das estirpes autoaglutinantes. Para essa análise foi utilizado o coeficiente de concordância simples, demonstrando o agrupamento das 26 estirpes mosquitocidas (TE1), quando examinadas com as duas estirpes atóxicas de *B. thuringiensis* (TE2 e TE3).

Tabela 5: Perfil dos Eletromorfos das Estirpes Autoaglutinantes de *Bacillus thuringiensis*

LFB-FIOCRUZ	ALDH	EST	GPI	LDH	MDH	ME	NP	P2	P3	PD	TE
584	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
853	7	3;8	2	3	2	2	3	5	2	1	2
859	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1

894	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
897	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
907	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
966	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
968	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
969	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1028	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1035	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1036	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1037	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1038	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1039	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1041	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1

... continuação da Tabela 5.

1042	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1043	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1044	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1061	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1062	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1067	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1068	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1070	7	3;8	2	3	2	2	4	5	2	1	3
1071	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1072	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1073	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1074	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1
1076	4	4;9	2	3	2	2	4	5	2	1	1

Legenda:

Malato Desidrogenase, MDH; Enzima Mállica, ME; Alanina Desidrogenase, ALDH; Leucina Desidrogenase, LDH; Nucleosídeo Fosforilase, NP; Fosfoglucoze Isomerase, GPI; Esterase, EST; Peptidase 3, P3; Peptidase 2, P2 e Peptidase D, PD.

Coefficiente de Concordância Simples

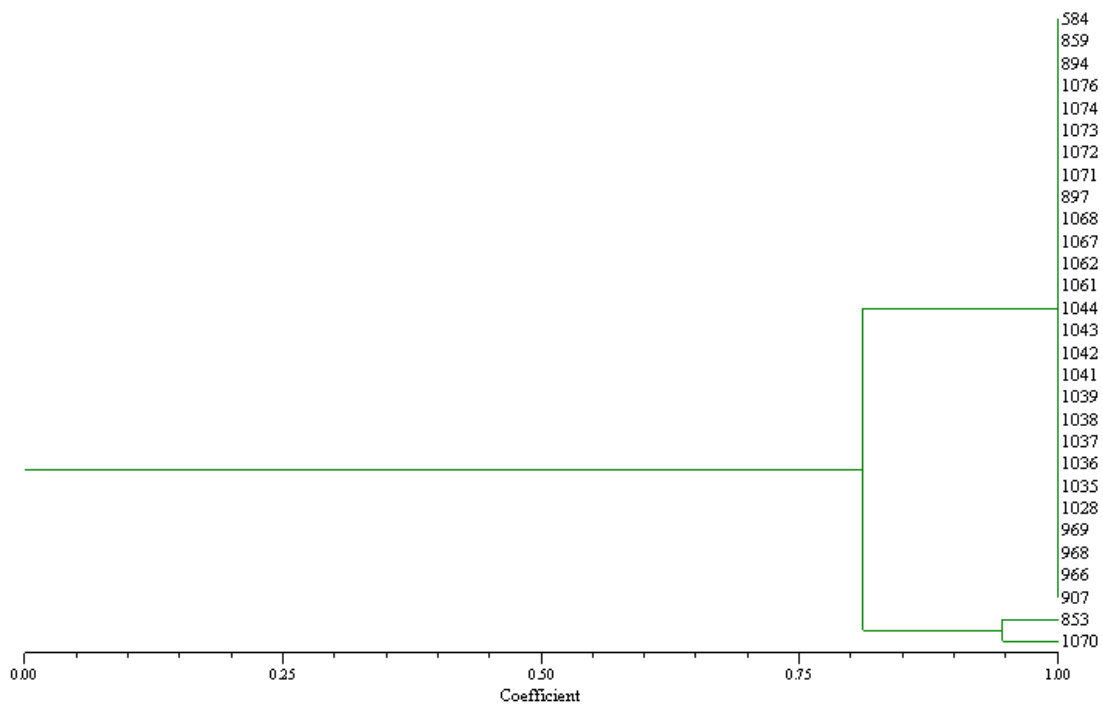


Figura 17: Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise isoenzimática das estirpes autoaglutinantes de *Bacillus thuringiensis*

4.5 – Amplificação Aleatória de DNAs Polimórficos (RAPD-PCR)

Foi realizada uma análise dos perfis de RAPD obtidos pela amplificação aleatória de DNAs polimórficos, utilizando-se seis iniciadores descritos anteriormente e encontrados no kit “Ready to Go RAPD Analysis Band”.

Através dos fragmentos amplificados pelo RAPD-PCR foi possível estabelecer uma correlação entre as 28 estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis*. Através dos perfis de RAPD-PCR produzidos para cada um dos seis iniciadores foi possível discriminar entre as estirpes mosquitocidas e as que não apresentaram nenhuma toxicidade para os insetos-vetores em estudo.

Os seis iniciadores produziram três diferentes perfis de RAPD para estirpes autoaglutinantes. Entre o grupo das estirpes mosquitocidas, os iniciadores não detectaram nenhum polimorfismo gênico entre os isolados, enquanto que para as estirpes LFB-FIOCRUZ 853 e 1070 amplicons distintos foram demonstrados para cada um dos iniciadores.

Estes iniciadores reproduziram um total de 50 fragmentos variando de 200pb a 1700pb entre as 28 estirpes de *B. thuringiensis* autoaglutinantes estudadas, com média de 8 fragmentos

por oligonucleotídeo iniciador. Cada iniciador foi amplificado duas vezes e os resultados foram reprodutíveis. Entre o grupo de iniciadores utilizados, o iniciador número 1 foi o mais discriminatório, pois produziu 13 fragmentos polimórficos (Figura 18). Um fragmento de 1600pb, presente nas estirpes mosquitocidas, variou consideravelmente na intensidade. Logo, isto ilustra a ineficiência da amplificação do RAPD-PCR para fragmentos maiores que 1500pb. Portanto, somente os fragmentos que apresentaram reprodutíveis foram considerados em nossas análises posteriores. Os resultados do número de fragmentos obtidos em cada iniciador encontram-se na Tabela 9.

No dendrograma gerado, onde se utilizou o coeficiente de concordância simples (Figura 19), a partir das análises das bandas observadas no gel, amplificado pelo o iniciador número 1, todas as estirpes de *B. thuringiensis* mosquitocidas formaram um grupo que apresentou 100% de identidade, separadas das estirpes LFB-FIOCRUZ 853 e 1070, que no fenograma apresentaram 73% e 21% de afinidade, respectivamente, com relação ao grupo principal, das estirpes mosquitocidas.

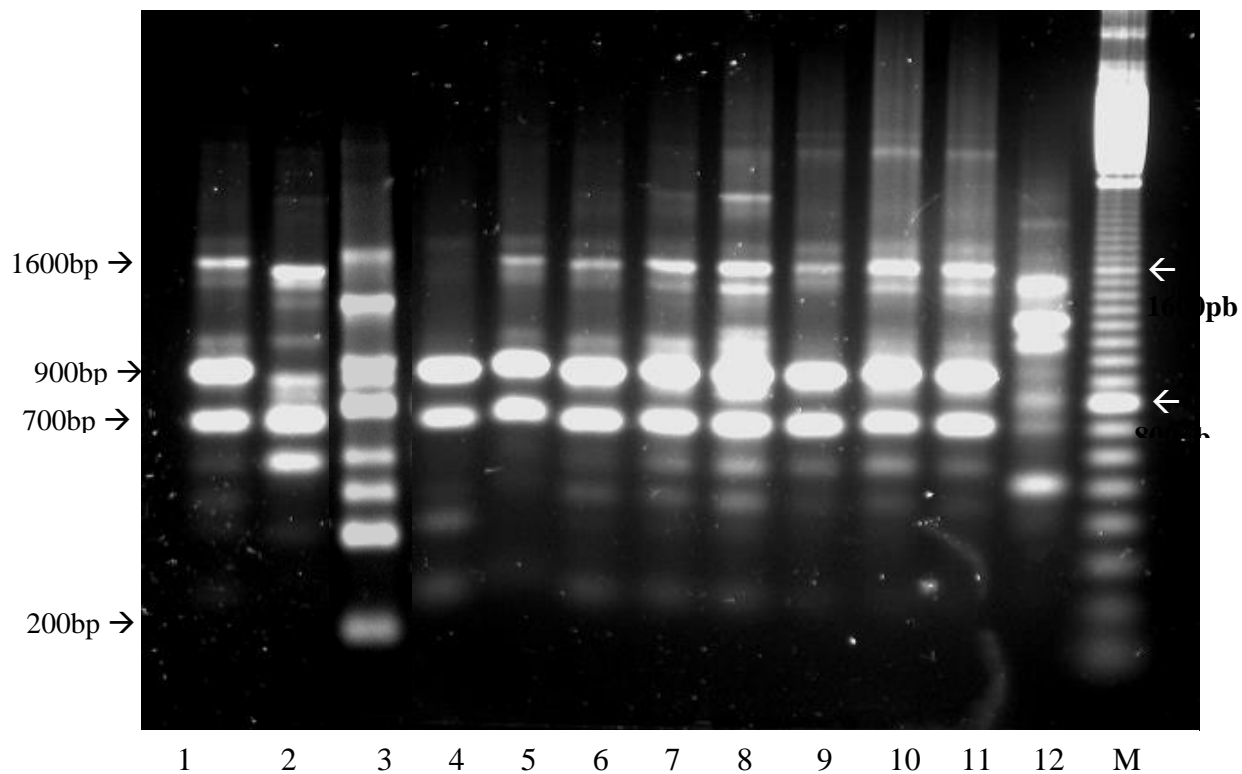


Figura 18: Perfil do polimorfismo amplificado ao acaso das estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* gerado pelo o iniciador nº1. **M** (Peso Molecular) - Escala de 100pb de DNA; 1, *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (LFB-FIOCRUZ 584); 2, LFB-FIOCRUZ 853; 3, LFB-FIOCRUZ 1070; 4, LFB-FIOCRUZ 1038; 5, LFB-FIOCRUZ 1043; 6, LFB-FIOCRUZ 969; 7, LFB-FIOCRUZ 859; 8, LFB-FIOCRUZ 1042; 9, LFB-FIOCRUZ 1072; 10, LFB-FIOCRUZ 1061; 11, LFB-FIOCRUZ 1062; 12, *E. coli* BL21.

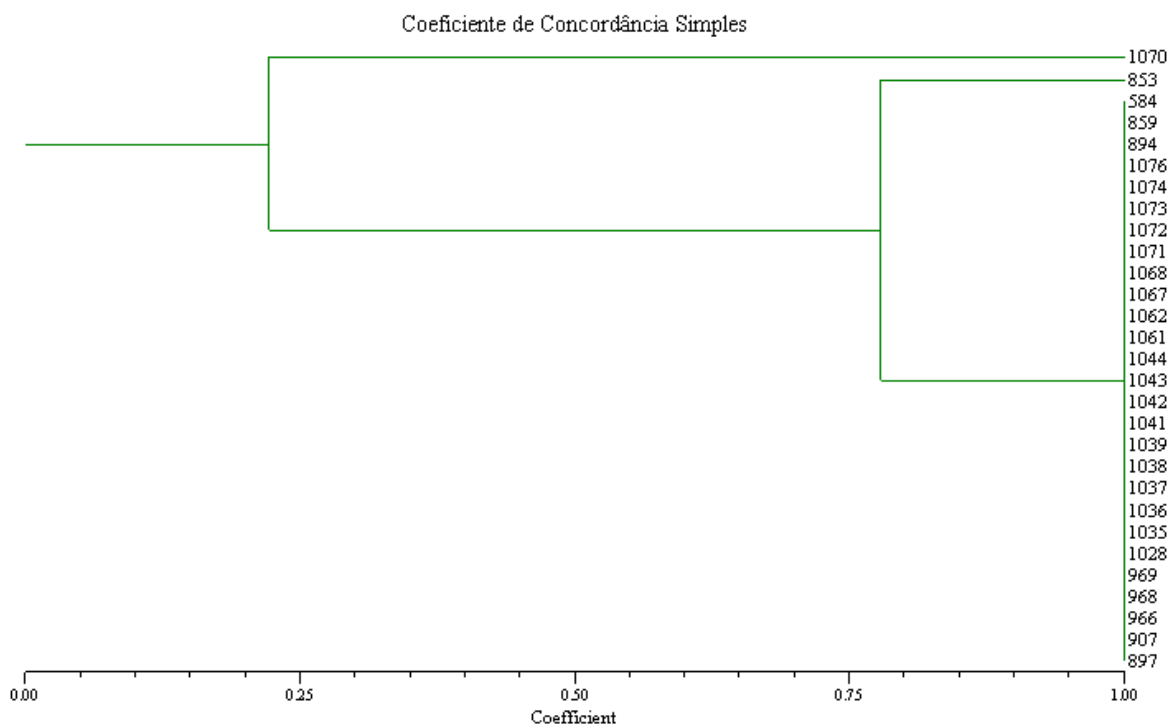


Figura 19: Fenograma resultante da taxonomia numérica baseada em dados da análise do RAPD-PCR amplificado pelo o iniciador nº1 das estirpes autoaglutinantes de *Bacillus thuringiensis*

Tabela 9: Resultados dos Fragmentos Obtidos por Cada Iniciador na Análise do RAPD-PCR.

Iniciadores	Seqüência (5' – 3')	Número de Fragmentos polimórficos	Tamanho (bp)
1	GGTGCGGGAA	13	200-1500
2	GTTTCGCTCC	5	400-1000
3	GTAGACCCGT	3	500-600
4	AAGAGCCCGT	8	550-1700
5	AACGCGCAAC	11	400-1600
6	CCCGTCAGCA	10	500-1400

5 – DISCUSSÃO

Desde quando o *B. thuringiensis* foi descrito como uma nova espécie em 1915, vários métodos à classificação de sorovares têm sido propostos (De Barjac & Bonnefoi, 1973; Hofte & Whiteley, 1989; Bagei et al, 1991, Crickmore et al, 1998). Inicialmente, para caracterizar as estirpes de *B. thuringiensis* foram utilizados os caracteres citomorfológicos, fisiológicos e bioquímicos, empregando-se técnicas microbiológicas convencionais (Heimpel & Angus, 1958). Porém, com o crescente número de novos isolados de *B. thuringiensis* originados em diferentes países, no início da década de 60, surgiram inúmeros problemas em relação a classificação dos sorovares, e portanto, somente esses critérios bioquímicos e fisiológicos não eram mais suficientes, devido à variabilidade existente nessas linhagens.

Com o surgimento da classificação por método sorológico, baseada na reação de aglutinação de anticorpos específicos com antígenos flagelares, houve um incremento na classificação intra-específica das várias linhagens de *B. thuringiensis* (De Barjac & Bonnefoi, 1962). Em 1963, esses mesmos autores foram capazes de identificar nove sorotipos. No ano de 1981, já eram estabelecidos 15 sorotipos, abrangendo 22 sorovares desse bacilo (De Barjac, 1981). Na atualização realizada por Lecadet et al (1999) foram estabelecidos 69 sorotipos com 13 grupos sub-antigênicos que perfazem 82 sorovares de *B. thuringiensis*. Atualmente, existem 91 sorovares desta bactéria relacionadas no NCBI (2004) classificadas de acordo com esse critério (De Barjac & Frachon, 1990).

Segundo Lecadet et al (1999), existem duas situações que limitam a classificação flagelar clássica. A primeira está no fato de existirem estirpes sem inclusões para-esporais e, deste modo, são consideradas como *B. cereus*, e a segunda, são as estirpes autoaglutinantes. Os autores relatam que alguns *B. cereus* possuem antígenos que reagem com soros específicos dos sorotipos flagelares (antígenos H) de *B. thuringiensis*, e certos isolados provavelmente originaram-se de linhagens de *B. thuringiensis*, que por algum motivo, perderam os plasmídeos que codificavam as proteínas do cristal. Já as estirpes autoaglutinantes não permitem a classificação flagelar clássica. As culturas flageladas dessas linhagens aglutinam espontaneamente em solução fisiológica de NaCl a 0,85%, na ausência do anti-soro específico quando submetidas às condições

experimentais necessárias para os testes sorológicos em todas as etapas de crescimento, desse modo, tornam impossível a caracterização antigênica. Além disso, algumas estirpes de *B. thuringiensis*, denominadas cepas não-móveis, como *B. thuringiensis* sorovar *wuhanensis*, também escapam à sorotipagem flagelar (De Barjac & Frachon, 1990).

Em 1990, De Barjac & Frachon estabeleceram uma chave de classificação experimental conforme as reações bioquímicas, derivada de uma análise computacional envolvendo em torno de 80 caracteres fenotípicos, utilizando 1.600 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes sorovares. Os autores observaram a falta de correlação entre os caracteres bioquímicos e os sorovares. Todavia, quando são obtidos resultados discordantes na sorotipagem flagelar, os caracteres bioquímicos auxiliam como um fator discriminatório.

Por outro lado, a posição taxonômica das 28 estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* foram comprovadas em relação ao que se conhece para a espécie, empregando-se testes clássicos que auxiliaram neste mistério. Assim, ao lado da caracterização citomorfológica (Tabela 2), os critérios bioquímicos e fisiológicos de Gordon et al (1973) foram realizados, como por exemplo, crescimento anaeróbico, hidrólise da caseína, redução do nitrato a nitrito, produção do acetil-metil-carbinol, entre outros, ainda a hidrólise da esculina feita segundo Cowan & Steel (1974), enquanto as hidrólises de amido, gelatina, a utilização de citrato de sódio e produção da lecitinase foram realizados segundo Claus & Berkeley (1986) e Vasconcellos & Rabinovitch (1994), com todos os resultados falando em favor da espécie em questão (Tabela 3).

Os resultados obtidos na patogenicidade, também revelaram que as 26 estirpes autoaglutinantes, que apresentaram alta toxicidade (mortalidade larval > que 50%) contra larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, igualmente demonstraram resultados semelhantes aos do *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 sorotipo flagelar H 14 (LFB-FIOCRUZ 584), linhagem considerada de referência para o sorotipo. Já, os isolados LFB-FIOCRUZ 853 e 1070 quando submetidos aos bioensaios qualitativos, apresentaram baixa toxicidade (mortalidade larval de 0 % a 20%) para os dípteros estudados. Com relação às respostas aos caracteres bioquímicos, as estirpes demonstraram resultados congruentes aos apresentados pela cepa de referência LFB-FIOCRUZ 584, com a ressalva para ausência da formação do acetil-metil-

carbinol e do crescimento em caldo nutriente contendo NaCl a 5%, por parte do isolado LFB-FIOCRUZ 853.

Para ampliar a caracterização das estirpes autoaglutinantes isoladas de diferentes nichos ecológicos, realizou-se uma avaliação do comportamento das mesmas frente à 22 drogas antimicrobianas, uma vez que a presença ou ausência de resistência e, ou, sensibilidade, favorecem o conhecimento da disseminação de linhagens em diversos locais.

Estas características estão muitas vezes associadas a plasmídeos, que podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie, de espécies relacionadas e, mesmo, entre grupos taxonômicos distintos (Broda, 1979). Em *B. thuringiensis* e *B. cereus*, espécies geneticamente relacionadas, a transferência de plasmídeos que contêm genes que codificam as proteínas do cristal já é conhecida (Gonzalez et al, 1982).

Logo, ressalta-se a questão de que plasmídeos conjugados a outros genes também sejam transferidos, incluindo os genes para resistência a agentes antimicrobianos (no caso de estarem presentes em plasmídeos) contribuindo para expressiva diversidade genética nestas espécies. Uma outra questão, refere-se ao fato de que linhagens de *B. thuringiensis* vêm sendo associadas a surtos de gastroenterites (Jackson et al, 1995) e a ocorrência de genes de enterotoxinas de *B. cereus* já foi demonstrada em linhagens de *B. thuringiensis* (Rivera et al, 2000; Hansen & Hendriksen, 2001; Yuan et al, 2002). Damgaard (1995) demonstrou que genes da enterotoxina T e da hemolisina BL de *B. cereus* estavam presentes em linhagens de *B. thuringiensis*, incluindo algumas cepas provenientes de produtos comercializados. Portanto, tornam-se necessárias a identificação e caracterização cuidadosa de linhagens que posteriormente venham a ser usadas como bioinseticidas bacterianos.

Esses fatos sugeriram a caracterização das estirpes autoaglutinantes frente aos 22 antimicrobianos relacionados no Quadro 1. As Figuras 12 e 13 ilustram os dendrogramas construídos a partir das respostas de resistência e sensibilidade, nas quais se observa uma expressiva heterogeneidade entre as estirpes autoaglutinantes isoladas de origens distintas. Ressalta-se que, essa heterogeneidade e o perfil de multi-resistência das estirpes de *B. thuringiensis* autoaglutinantes, já foram demonstrados em Silva (2002), no estudo da resistência a

antimicrobianos de estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes a 34 sorovares e *B. cereus* isolados de distintos materiais.

Com respeito aos resultados obtidos através da análise das δ -endotoxinas totais realizados em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio/SDS-PAGE a 12%, as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* foram distribuídas em cinco grupos distintos. O Grupo 1 inclui as 23 estirpes *B. thuringiensis* autoaglutinantes mosquitocidas, as quais apresentaram o mesmo perfil protéico da linhagem *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS-82 sorotipo flagelar H 14 (LFB-FIOCRUZ 584) com proteínas de 135-125 kDa (Cry4Aa e Cry4Ba); 68 kDa (Cry11Aa) e 28 kDa (Cyt1Aa). Estes resultados foram comparáveis com aqueles obtidos por Ragni et al (1996), que demonstraram que estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* possuem atividade entomotóxica para larvas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* e similaridade com as proteínas do cristal da cepa de referência LFB-FIOCRUZ 584.

No Grupo 2 inserem-se as estirpes mosquitocidas LFB-FIOCRUZ 969 e 1038 que apresentaram um perfil de bandas protéicas comuns com a cepa de referência, porém com a presença de uma proteína com peso molecular de aproximadamente de 55 kDa. O Grupo 3 foi formado pela estirpe mosquitocida LFB-FIOCRUZ 1043, que também apresentou um perfil de proteínas comum com a cepa de referência, além de uma proteína de peso molecular de 100 kDa. Estas proteínas talvez possam representar novos genes *cry* ainda não conhecidos.

Já nos Grupos 4 e 5 incluem-se as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* LFB-FIOCRUZ 853 e 1070, respectivamente. Ambos os isolados apresentaram um conteúdo protéico totalmente diferente das proteínas do cristal que compõem a cepa de referência, além de apresentarem baixa atividade tóxica para os dípteros em estudo. O perfil de proteína que compõe a estirpe LFB-FIOCRUZ 853 apresenta um polipeptídeo de 100 kDa e um outro menor de peso molecular em torno de 50-55 kDa, totalmente distinto da estirpe LFB-FIOCRUZ 1070. Já foi demonstrado (Yamamoto & Iizuka, 1983) que o *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* HD-1 produz dois tipos de cristais por célula, um cristal bipiramidal composto de proteínas de 135 kDa e um cristal cubóide de proteínas de 65kDa. A migração das proteínas do cristal da estirpe LFB-FIOCRUZ 1070 apresentou um perfil composto de proteínas de 140-135kDa e 65kDa semelhante aos pesos moleculares encontrados na cepa *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki* HD-1, o que leva a

acreditar que esta estirpe autoaglutinante provavelmente pertença ao sorovar *kurstaki*. Com relação a estirpe LFB-FIOCRUZ 853, não foi possível identificar, através dos estudos aqui realizados, a que sorovar pertence.

Com relação aos resultados da análise do perfil isoenzimático (MLEE), com base nas 10 enzimas utilizadas neste estudo, estes revelaram a presença de três tipos eletroforéticos (TEs) distintos. No TE1 encontram-se as estirpes mosquitocidas de *B. thuringiensis* autoaglutinantes e, portanto, pertencem ao mesmo TE determinado por Zahner et al (1989, 1992) para a linhagem de referência LFB-FIOCRUZ 584 (Tabela 5). Vale ressaltar que, segundo os mesmos autores, não existe correlação entre o TE e o sorovar, pois cepas com o mesmo sorovar podem pertencer a TE diferentes.

Já as estirpes LFB-FIOCRUZ 853 e 1070 foram agrupadas nos TE2 e TE3, e portanto, apresentaram perfis isoenzimáticos distintos da cepa de referência, como também não compartilharam semelhança com nenhum TE determinado previamente por Zahner et al (1994), para as 55 linhagens de *B. thuringiensis* de diferentes sorovares utilizadas em seu estudo. Estes mesmos autores ainda demonstraram que o *locus* enzimático NP alelo 4 foi monomórfico nesta espécie, fato que não ocorreu entre as estirpes autoaglutinantes, pois o isolado LFB-FIOCRUZ 853 apresentou no *locus* enzimático NP o alelo 3, diferenciando-se das demais estirpes, que demonstraram alelo 4 neste *locus* gênico. Os dados enzimáticos correspondentes às diferenças na mobilidade nestes três *loci* gênicos (ALDH, NP e EST), provavelmente, resultam de diferenças em nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas. A Figura 17 ilustra o fenograma construído a partir dos dados da análise isoenzimática apresentando o agrupamento das 26 estirpes mosquitocidas com cerca de 81% de similaridade às duas estirpes atóxicas autoaglutinantes.

Estes resultados constituíram-se num estímulo para se realizar um estudo no qual se empregou iniciadores de seqüências aleatórias, utilizando como ferramenta molecular o método de RAPD-PCR, buscando-se assim correlacionar o perfil das 28 estirpes autoaglutinantes com a atividade biológica apresentada nos bioensaios qualitativos.

O RAPD-PCR é um método altamente discriminativo para diferenciar estirpes, podendo também ser utilizado para construir iniciadores específicos em níveis taxonômicos intra-

específicos como, por exemplo, sorovar ou patovar. Marcadores RAPD também se mostram úteis na classificação de microrganismos. Ao comparar os perfis obtidos às diferentes linhagens ou espécies, é possível detectar-se fragmentos (bandas) diferenciais que sejam específicos para o grupo ou espécie de interesse, mas ausente em outras espécies relacionadas (Rosato et al, 2002).

Uma aplicação desse método foi efetuada por Rivera et al (2003), ao analisar 126 linhagens de *B. thuringiensis* que representavam 56 sorovares provenientes de diversos países. Os autores agruparam essas linhagens em 58 tipos genômicos utilizando o perfil da amplificação aleatória de DNAs polimórficos. Os perfis de RAPD-PCR revelaram que a espécie é heterogênea. Entretanto, linhagens dentro de alguns sorovares são genomicamente homogêneas e representam grupos clonais, enquanto outros sorovares são distintos e dentro desses o perfil de RAPD não se correlaciona.

Em outro estudo, Pattanayak et al (2001), ao utilizarem o método de RAPD-PCR, foram capazes de distinguir sorotipos de *B. thuringiensis* e estabelecer uma correlação genética entre os sorovares e sorotipos. Logo, o polimorfismo expresso no perfil de RAPD e o baixo nível de similaridade entre os diferentes sorovares de *B. thuringiensis* estão associados aos altos níveis da diversidade genética, a qual é refletida pela diversidade das reações de aglutinação do antígeno flagelar e a presença de distintas toxinas com diferentes especificidades para insetos.

Esta acentuada divergência genética em linhagens de *B. thuringiensis* pode ser explicada pela presença de vários plasmídeos nas linhagens e seu mecanismo de conjugação, assim como, transposons com seqüências de repetições invertidas, flanqueando os genes das endotoxinas, auxiliam na alta freqüência de rearranjos do DNA (Pattanayak et al, 2001).

Um resultado também favorável à utilização de RAPD diz respeito ao que foi obtido por Brousseau et al (1993), quando os autores acharam possível a discriminação de diferentes sorovares de *B. thuringiensis* por RAPD-PCR, além do uso de iniciadores específicos na identificação de linhagens de *B. thuringiensis* sorovar *kurstaki*, provenientes de diferentes produtos comerciais. Esses autores ainda demonstraram que sorovares de *B. thuringiensis* podem ser diferenciados com base nos perfis de RAPD e que mesmo linhagens agrupadas num mesmo sorotipo podem ser distinguidas.

Na literatura destacam-se trabalhos que mostram a utilização de iniciadores aleatórios universais para a identificação por PCR de pequenas porções do genoma bacteriano, o qual possibilita a classificação de microrganismo como visto por Svenson et al (1999), Ferreira et al (2000) e Sudheesh et al (2002).

Atualmente, com o crescente uso das técnicas moleculares, um grande número de espécies e subespécies de bactérias vêm sendo realocadas na tentativa de se obter uma classificação mais objetiva, que reflita as reais relações de parentesco entre os diversos grupos (Ash et al, 1991, Ash et al, 1993 e Shida et al, 1996).

No presente estudo, o polimorfismo de DNA demonstrado mediante a amplificação pelo método de RAPD-PCR, originou com cada um dos seis iniciadores ensaiados, três diferentes perfis de RAPD no conjunto das 28 estirpes de *B. thuringiensis* autoaglutinantes, possibilitando, desta forma, correlacionar os perfis obtidos com a toxicidade verificada nos bioensaios qualitativos (Figura 18). Todos os amplicons produzidos pelas estirpes mosquitocidas, para cada iniciador, apresentaram-se idênticos à cepa de referência *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* (LFB-FIOCRUZ 584).

Para as estirpes LFB-FIOCRUZ 853 e 1070, cada iniciador reproduziu amplicons distintos, o que demonstra tratar-se provavelmente de sorovares diferentes. O dendrograma gerado pelo iniciador número 1, baseado na análise dos fragmentos observados no gel, para o qual se utilizou o coeficiente de concordância simples, demonstrou que os isolados formaram um grupo com 100% de similaridade onde encontram-se alocadas as estirpes que apresentaram toxicidade para os dípteros aqui estudados. Neste grupo encontram-se estirpes isoladas de diferentes origens (solos, insetos, condimentos e rizosfera) e locais distintos, talvez, indicando a ampla dispersão dessa bactéria no ambiente.

Malkani et al (1999), ao utilizarem a técnica de RAPD-PCR, detectaram o polimorfismo genético entre isolados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes regiões da Jordânia. Segundo esses autores, marcadores RAPD amplificados e comuns para alguns isolados podem ser usados para desenvolver sondas de DNA específicas que auxiliem no isolamento e identificação de novas estirpes de *B. thuringiensis*.

Deste modo, mesmo não sendo identificadas pela sorologia flagelar clássica, as 26 estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* apresentaram na análise isoenzimática e no perfil de RAPD, características compatíveis àquelas conhecidas em *B. thuringiensis* sorovar *israelensis*.

Segundo Rivera et al (2003) a técnica do RAPD-PCR pode ser uma alternativa à sorotipagem de *B. thuringiensis*. Lecadet et al (1999) sugerem que a classificação flagelar seja usada em paralelo com métodos moleculares, particularmente para cepas de *B. cereus* que reagem com soros específicos dos sorotipos flagelares de *B. thuringiensis* e cepas autoaglutinantes. Pattanayak et al (2001) sugerem que análise de RAPD pode ser usada na caracterização genotípica de sorovares de *B. thuringiensis* como um complemento à sorologia flagelar.

Além da técnica do RAPD-PCR, estão sendo desenvolvidas novas ferramentas moleculares que possam auxiliar na identificação de sorovares de *B. thuringiensis*, como por exemplo, a que utiliza o polimorfismo dos fragmentos amplificado dos genes flagelina (AFPF-PCR). Procura-se com esta técnica desenvolver um novo critério à classificação dos sorovares de *B. thuringiensis* (Yu et al, 2002). Estes autores empregaram um par de iniciadores específicos, Fla 5 (5'-GGCGTCGACATGAGAATTAATACAAACATT-3') e Fla 3 (5'-CGCCTGCAGTTATTGT AATAATTTAGAAGCC-3'), desenhados com base nas seqüências dos genes flagelina conhecidos. Segundo estes autores, este método é uma tentativa preliminar de classificar *B. thuringiensis* com base em 35 sorovares, e portanto, a análise de mais sorovares será necessária para concluir se este método poderá ser utilizada como uma ferramenta para discriminar sorovares de *B. thuringiensis*.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, a combinação das metodologias de RAPD-PCR e MLEE podem apresentar uma alternativa, mesmo adicional, para avaliar novos isolados de *B. thuringiensis* e, deste modo, contribuir para o aprimoramento do conhecimento de diferenças intra-específicas dessa importante e útil espécie bacteriana.

6 – CONCLUSÕES

- Das metodologias empregadas no presente estudo, nenhuma delas permitiu a discriminação entre as estirpes de *B. thuringiensis* autoaglutinantes com referência aos seus nichos ecológicos.
- Quando se utilizaram as provas bioquímicas e fisiológicas, os resultados obtidos não foram capazes de diferenciar as estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* tóxicas para as larvas dos insetos-vetores, das atóxicas.
- Entre as 28 estirpes autoaglutinantes de *B. thuringiensis* ressaltam-se o perfil de multi-resistência e a expressiva heterogeneidade de comportamento mediante ao emprego de 22 drogas antimicrobianas.
- Quanto à ação larvicida, observou-se uma correlação entre as atividades biológicas para larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e perfis isoenzimáticos e de RAPD. Todas as 26 estirpes tóxicas foram alocadas no mesmo tipo eletroforético (TE1), como também, apresentaram o mesmo marcador molecular para RAPD-PCR (iniciador 1).

- Tal correlação não foi possível com o perfil de proteínas tóxicas, onde somente 23 estirpes, dentre as 26 estirpes mosquitocidas, apresentaram um perfil de proteínas comum do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, e portanto, foram inseridas no Grupo 1.
- A presença de uma proteína com peso molecular em torno de 55kDa nas estirpes mosquitocidas LFB-FIOCRUZ 969 e 1038, e uma proteína de aproximadamente 100kDa na estirpe mosquitocida LFB-FIOCRUZ 1043, distinguiram estas estirpes do perfil de proteína do *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* e excluíram estas estirpes do grupo principal e incluíram-nas nos Grupos 2 e 3, respectivamente.
- As estirpes atóxicas LFB-FIOCRUZ 853 e 1070 distinguiram-se em todas as metodologias utilizadas, exceto nos caracteres fenotípicos, acreditando-se que provavelmente pertençam a sorovares distintos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agaisse H. & Lereclus D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIa* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *J. Bacteriol.* 1994; 176:4734-4741.
- Angsuthanasombat C, Crickmore N. & Ellar DJ. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; 94:63-68.
- Arantes O & Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 1991; 108: 115-119.
- Aronson AI. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002; 59: 417-425.
- Aronson AI, Han E-S, McGaughey W & Johnson D. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57:981-986.
- Ash C, Farrow JAE, Darsh M, Stackebrandt E & Collins MD. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991a; 41: 343-346.
- Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S & Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 1991b; 13: 202-206.
- Ash C, Priest FG & Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacillus using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 1993; 64: 253-260.
- Aurora N, Selvapandiyan A, Agrawal N & Bhatnagar RK. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 310: 158-162.
- Bagei H, Shareef SR & Ozdomar K. Application of numerical taxonomy in classification of varieties of *Bacillus thuringiensis*. *Doga Turk Biyol Derg.* 1991; 15: 70-81.
- Baida GE & Kuzmin NP. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Acta* 1995; 1264: 151-154.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G & Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* 1992; 38: 70-76.
- Baum JA. Tn5401, a new class II transposable element from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 1994; 176:2835-2845.
- Baum, JA & Malvar T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 1995; 18:1-12.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

Ben-Dov E, Nissan G, Pelleg N, Manasherob R, Bousshiba S & Zaritsky A. Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. *Plasmid* 1999; 42: 186-191.

Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sinai R, Manasherob R, Khamraev A, et al Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63(12): 4883-4890.

Bernhard K, Jarrett P, Meadows M, Butt J, Ellis DJ, Roberts GM, Pauli S, Rodgers P & Burges HD. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 1997; 70: 59-68.

Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, Jones AF, Murphy L, Quail Ma et al Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68 (10): 5082-5095.

Bonnefoi A & De Barjac H. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. *Entomophaga* 1963; 8:223-229.

Bourgouin C, Delécluse A, Ribier J, Klier A & Rapoport G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. *J. Bacteriol.* 1988; 170:3575-3583.

Bourque SN, Valéro JR, Mercier J, Lavoie MC & Lévesque RC. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 523-527.

Bravo A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 1997; 179:2793-2801.

Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(12): 4965-4972.

Broda P 1979. *Plasmids*. W.H. Freeman and Company Limited. San Francisco, USA.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 114-119 (1993).

Burtsera LI, Burlak VA, Kalmikova V, De Barjac H & Lecadet MM. *Bacillus thuringiensis novosibirsk* (Serovar H-24a:24c), a new subspecies from the West Siberian Plain. *J. Invertebr. Pathol.* 1995; 66: 92-93.

Budarina ZI, Sinev MA, Mayorov SG et al. Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. *Arch. Microbiol.* 1994; 161: 252-257.

Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 2415-2422.

Buzdin AA, Revina LP, Kostina LI, Zalunin IA & Chestukhina GG. Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry (Mosc.)* 2002; 67(5): 540-546.

Carlson CR & Kolstø A-B. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. J. Bacteriol. 1993; 175: 1053-1060.

Carlson CR, Caugant DA & Kolstø A-B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60:1719-1725.

Carlson CR, Johansen T, Lecadet M-M & Kolstø A-B. Genomic organization of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715. Microbiology 1996; 142:1625-1634.

Carozzi N B, Kramer VC, Warren GW, Evola S & Koziel MG. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57: 3057-3061.

Carrol J, Li J & Ellar DJ. Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Biochem. J. 1989; 261(1): 99-105.

Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo-Coutinho CJPC & Rabinovitch. Histopathological and ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004; 99: 493-498.

Cerón J., Covarrubias L, Quintero R, Ortiz A, Ortiz M, Aranda E, Lina L & Bravo A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60: 353-356.

Cerón, J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L & Bravo A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61: 3826-3831.

Chang C, Yu YM, Dai SM, Law SK & Gill SS. High-level *cry IVD* and *cyt A* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 815-821.

Chang JH, Roy JY, Je, YH, Park HW, Jin BR, Woo SD & Kang SK. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD-1 encoding *Cry1E*. Lett. Appl. Microbiol. 1998; 26: 387-390.

Chang WXZ, Gahan LJ, Tabashnik BE & Heckel DG. A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in *Lepidoptera*. Insect Mol. Biol. 1999; 8: 171-177.

Chaufaux J, Marchal M, Gilois N, Jehanno I & Buisson C. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes à travers le monde. Can. J. Microbiol. 1997; 43: 337-343.

Chilcott CN & Ellar DJ. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. J. Gen. Microbiol. 1988; 134: 2551-2558.

Choma C & Kaplan H. *Bacillus thuringiensis* crystal protein: effect of chemical modification of the cysteine and lysine residues. J. Invert. Pathol. 1992; 59: 75-80.

Claus D & Berkeley RCW. Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986, vol. 2, 1104-1139p.

Cleave AP, Williams R & Hedges RJ. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of CryV-like insecticidal protein genes and characterization of a CryV gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 1683-1687.

Cowan ST & Steel KJ. Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. Edition Cambridge University Press, London. 1974.

Conn HJ, Jennison MW & Weeks OB. Routine tests for the identification of bacteria. In: Manual of Microbiological Methods. Mc Graw – H:II Book Company, Inc, London; 1957. 140-168p.

Crickmore N. The diversity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. In: Charles J-F, Delécluse A & Nielsen-LeRoux C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Klumer Academic Publishers; 2000.65-78p.

Crickmore N, Bone EJ, Williams JA & Ellar DJ. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiol. Lett. 1995; 131: 249-254.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson, J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J & Dean DH. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998; 62 (3): 807-813.

Daffonchio D, Borin S, Frova G, Gallo R, Mori E, Fani R & Sorlini C. A randomly amplified polymorphic DNA marked specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*". Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65 (3): 1298-1303.

Dai SM & Gill SS. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry IVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. Insect Biochem. Molec. Biol. 1993; 23: 273-283.

Damgaard PH. Diarrhoeal enterotoxin production by of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis* – based insecticides. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1995; 12: 245-250.

Dean DH, Rajamohan F, Lee MK, Wu SJ, Chen XJ, Alcantara E & Hussain SR. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins site-directed mutagenesis - a minireview. Gene 1996; 179: 11-117.

De Barjac H. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype 14. C.R. Acad. Sci. 1978; 286: 797-800.

De Barjac H. Insect Pathogens in the Genus *Bacillus*. In: Pathogenesis of Invertebrate Microbiol Diseases. Davidson E. Ed. Allanhe Osmin & C°, Section II, Chapt.10, 1981. 241-250p.

De Barjac H & Lemille F. Presence of flagellar antigenetic subfactors in sorotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 1970; 15: 139-140.

De Barjac H & Bonnefoi A. Essai de classification biochimique et sorologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. Entomophaga 1962; 7: 5-61.

De Barjac H & Bonnefoi A. Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga 1973; 18 5-17.

- De Barjac H & Bonnefoi A. A classification of strains *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Invertebr. Pathol. 1968; 11:335-347.
- De Barjac H & Frachon E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga 1990; 35(2): 233-240.
- Delécluse A, Bourgouin C, Klier A & Rapoport G. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. Mol. Gen. Genet. 1988; 214: 42-47.
- Delécluse A, Bourgouin C, Klier A & Rapoport G. Nucleotide sequence and characterization of a new insertion element, IS240, from *Bacillus thuringiensis israelensis*. Plasmid 1989; 21:71-78.
- Delécluse A, Charles JF, Klier A & Rapoport G. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. J. Bacteriol. 1991; 173: 3374–3381.
- Delécluse A, Poncet S, Klier A & Rapoport G. Expression of *cry IVA* and *cry IVB* genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 3922-3927.
- De Souza MT, Lecadet M-M & Lereclus D. Full expression of the *cryIII A* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. J. Bacteriol. 1993; 175:2952-2960.
- Denolf P, Hendrickx K, Van Damme J, Jansens S & Peferoen M. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. Eur. J. Biochem. 1997; 248: 748-761.
- Donovan WP, Tan Y & Slaney AC. Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of *in vivo* deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63:2311-2317.
- Du C & Nickerson KW. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62:2932-2939.
- Du J, Knowles BH, Li J & Ellar DJ. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. Biochem. J. 1999; 338: 185-193.
- Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol. Rev. 1993; 57:1-33.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA & Koziel MG. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Agricultural Sciences 1996; 93: 5389-5394.
- Federici BA. The future of microbial insecticides as vector control agents. J. Am. Mosq. Contr. Assoc., 1995; 11: 260-268.
- Ferré J, Escrache B, Bel Y & Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. FEMS Microbiol. Lett. 1995; 132:1-7.

Ferré J, Real MD, Van Rie J, Jansens S & Peferoen M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:5119-5123.

Ferreira H, Rodrigues Neto J, Gonçalves ER & Rosato YB. Primers específicos para *Xylella fastidiosa* baseados em fragmentos diferenciais de RAPD. Summa Phytopathologica 2000; 26: 15-20.

Ferreira ME & Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genéticas. 2ªed. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEM; 1996. 220p. (EMBRAPA-CERNAGEN Documento 20).

Fiúza LM. *Bacillus thuringiensis*: Características e o Potencial no Manejo de Insetos. Acta Biologica Leopoldensia 2001; 23: 141-156.

Fiúza LM, Nielsen-LeRoux C, Goze E, Frutos R & Charles J-F. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae): evidence of shared binding sites. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62: 1544-1549.

Fortes-Castilho R, Matsumura ATS, Diehl E & Fiúza LM. Susceptibility of *Nasutitermes ehrhardti* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies. Bras. J. Microbiol. 2002; 33:219-222.

Garczynski SF, Crim JW & Adang MJ. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57: 2816-2820.

Gazit E, Burshtein N, Ellar DJ, Sawyer T & Shai Y. *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin associates specifically with its synthetic helices A and C in the membrane bound state. Implications for the assembly of oligomeric transmembrane poros. Biochemistry 1997; 36: 15546-15554.

Gazit E, La Rocca P, Sansom MSP & Shai Y. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95:12289-12294.

Gazit E & Shai Y. The assembly and organization of the $\alpha 5$ and $\alpha 7$ helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin – relevance to a functional model. J. Biol. Chem. 1995; 270: 2571-2578.

Ge AZ, Rivers D, Milne R & Dean DH. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). J. Biol. Chem. 1991; 266:17954-17958.

Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Bassotti C, Baggiani A & Senesi S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two foods poisoning outbreaks. FEMS Microbiol. Lett. 2002; 208: 129-134.

Georghiou GP & Lagunes-Tejeda C. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations 1991; 318p.

Georghiou GP & Wirth MC. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63:1095-1101.

Gill SS, Cowles EA & Pietrantonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 1992; 37: 615-636.

Gill SS. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1995, 90: 69-74.

Goldberg LH & Margalit J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News 1977; 37: 338-358.

Gordon RE, Haynes WC & Pang CN. The Genus *Bacillus*. Agric. Handbook U. S. Department Agriculture, Washington, DC; 1973.

González JM-Jr, Brown BJ & Carlton BC. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79:6951-6955.

González, JM-Jr, Dulmage HT & Carlton BC. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 1981; 5:351-365.

Green BD, Battisti L & Thorne CB. Involvement of Tn4430 in transfer of *Bacillus anthracis* plasmids mediated by *Bacillus thuringiensis* plasmid pXO12. J. Bacteriol. 1989; 171:104-113.

Grochulski P, Masson L, Borisona S, Pusztai-Carey M, Schwartz J-L, Brousseau R & Cygler M. *Bacillus thuringiensis* Cry IA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. 1995; 254:447-464.

Guerchicoff A, Ugalde RA & Rubinstein CP. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 2716-2721.

Gutierrez P, Alzate O & Orduz S. A theoretical model of the tridimensional structure of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* Cry11Bb toxin deduced by homology modeling. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2001; 96(3): 357-364.

Habib MEM. 1982. Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larva de Lepidóptero e Díptera. Tese de Livre-Docência, Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas, 163p.

Hadrys H, Balick M. & Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1992; 1: 55-63.

Haider MZ & Ellar DJ. Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. J. Mol. Biol. 1989; 208:183-194.

Hallet B, Rezsöhazy R & Delcour J. IS231A from *Bacillus thuringiensis* is functional in *Escherichia coli*: transposition and insertion specificity. J. Bacteriol. 1991; 173:4526-4529.

Hansen BM, Damgaard PH, Eilenberg J & Pedersen, JC. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. J. Invertebr. Pathol. 1998; 71(2): 106-114.

Hansen BM & Hendriksen NB. *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* toxins. IOBC Bulletin 1998; 21: 221-224.

Hansen BM & Hendriksen NB. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67(1): 185-189.

Harwood CR & Cutting SM. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. Wiley & Sons Ltda, West Sussex, England; 1990. 65p.

Heimpel AM & Angus A. The taxonomy of insect pathogenic related to *Bacillus cereus* Frankland & Frankland. Can. J. Microbiol. 1958; 4: 531-541.

Hilder VA & Boulter D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – critical review. Crop protection 1999; 18: 171-191.

Hodgman, TC & Ellar DJ. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by computational analysis. DNA Seq. 1990; 1:97-106.

Höfte H & Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 1989; 53: 242-255.

Honée G & Visser B. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomol. Exp. Appl. 1993; 69: 145-155.

Hua G, Masson L, Jurat-Fluentes JL, Schwab G & Adang MJ. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67: 872-879.

Ibarra JE & Federici BA. Isolation of a relatively nontoxic 65 kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 1986; 165:527-533.

Iudina TG. A comparison of the antibacterial activity of the parasporal bodies of different bacilli. Izv Akad Nauk Ser Biol. 1996; 5: 535-541.

Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R & Kasatiya S. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. Appl. Microbiol. 1995; 21: 103-105.

Joung K-B & Côté J-C. A phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFLP-based ribotyping. J. Appl. Microbiol. 2001; 91: 279-289.

Juárez-Pérez V, Jacquemard P & Frutos R. Characterization of the type strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *cameroun* serotype H:32. FEMS Microbiology Letters 1994; 122: 43-48.

Jung CJ, Xu D, Chump YS & Côté J-C. A new insertion sequence, IS231M, in an autoagglutinable isolate of *Bacillus thuringiensis*. Plamid 2001; 45: 114-121.

Knight PJK, Knowles BH & Ellar DJ. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. J. Biol. Chem. 1995; 270:17765-17770.

Knowles BH. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ - Endotoxins. Adv. Ins. Physiol. 1994; 24: 275-308.

- Knowles BH & Dow JAT. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioassays* 1993; 15: 469-476.
- Knowles BH & Ellar DJ. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochem. Bioph. Acta* 1987; 924: 509-518.
- Knowles BH, Knight, PJV & Ellar DJ. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Roy. Soc. Lnd.* 1991; 245: 31-35.
- Knight, PJV, Crickmore N & Ellar DJ. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 1994; 11:429-436
- Koni PA & Ellar DJ. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ -endotoxins. *Microbiology* 1994; 140:1869-1880.
- Koo BT, Park SH, Choi SK, Shin BS et al Cloning of a novel crystal protein gene *cry1K* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995; 134: 159-164.
- Kramer KJ & Muthukrishnan S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use biopesticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1997; 27: 887-900.
- Krieger IV, Revina LP, Kostina LI, Buzdin AA, Zalunin IA, Chestukhina GG & Stepanov VM. Membrane proteins of *Aedes aegypti* larvae bind toxins Cry4A and Cry11A of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Biochemistry (Mosc.)* 1999; 64: 1163-1168.
- Krywienczyk J & Fast PG. Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 1980; 36: 139-140.
- Kumar PA, Sharma RP & Malik VS. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 1996; 42: 1-43.
- Kuo WS & Chak, KF. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 1369-1377.
- Laemmli UK & Favre M. Maturation of the Head of Bacteriophage T₄. I. DNA Packaging Events. *J. Mol. Biol.* 1973; 80: 575-599.
- Lecadet MM, Chaufaux J, Ribier J & Lereclus D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58: 840-849.
- Lechner M, Kupke T, Stefanovic S & Götz F. Molecular characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Molec. Microbiol.* 1989; 3: 621-626.
- Lecadet MM, Cosmo Dumanoir V, Hamon S, Frachon E, Ripouteau H. Catalogue of strains n°1, IEBC – Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* classified by “H” serotypes, Paris:WHO – Collaborating Centre, Inst. Pasteur, 1996.

- Lecadet MM, Frachon E, Cosmo Dumanoir V, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P & Thiéry I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 1999; 86: 660-672.
- Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, et al A *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62:80-86.
- Leal SCM, Bertioli DJ Butt TM & Peberdy JF. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. Mycol. Res. 1994; 98: 1077-1081.
- Lee HK & Gill SS. Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 4664-4670.
- Lee MK, Rajamohan F, Gould F & Dean DH. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61:3836-3842.
- Léonard C, Chen Y & Mahillon J. Diversity and different distribution of IS231, IS232 and IS240 among *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides*. Microbiology 1997; 143:2537-2547.
- Lereclus D, Delecluse A & Lecadet M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: Entewistle PF, Cory JS, Bailey MJ & Higgs SR. *Bacillus thuringiensis*, environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom; 1993. 37-69p.
- Lereclus D, Menou G & Lecadet M-M. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAMP1. Mol. Gen. Genet. 1983; 191:307-313.
- Lereclus D, Mahillon J, Menou G & Lecadet M-M. Identification of Tn4430, a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet 1986; 204:52-57.
- Lereclus D, Ribier J, Klier A, Menou G & Lecadet M-M. A transposon-like structure related to the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. EMBO J. 1984; 3:2561-2567.
- Lereclus D, Vallade M, Chaufaux J, Arantes O & Rambaud S. Expansion of the insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* genetic recombination. Bio/Technology 1992; 10:418-421.
- Liang Y, Patel SS & Dean DH. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. J. Biol. Chem. 1995; 270:24719-24724.
- Li J, Carroll J & Ellar DJ. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature 1991; 353: 815-821.
- Li J, Koni PA & Ellar DJ. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. J. Mol. Biol. 1996; 257: 129-152.
- Logan NA & Turnbull PCB. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press: Washington, D.C.; 2003. 445-447p.

- Loseva OI, Tiktopulo EI, Vasiliev VD, Nikulin AD, Dobritsa AP & Potekhin SA. Structure of Cry3A δ -endotoxin within phospholipids membranes. *Biochemistry* 2001; 40: 14143-14151.
- Losick R & Stragier P. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* 1992; 355:601-604.
- Lövgren A, Carlson CR, Eskils K & Kolstø AB. Localization of putative virulence genes on a physical map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *gelechiae* chromosome. *Curr. Microbiol.* 1998; 37: 245-250.
- McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 1985; 229:193-195.
- Mahillon J, Rezsöhazy R, Hallet B & Delcour J 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. *Genetica* 93:13-26
- Mahillon J, Seurinck J, Delcour J & Zabeau M. Cloning and nucleotide sequence of different iso-IS231 elements and their structural association with the Tn4430 transposon in *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 1987; 51:187-196.
- Malkawi HI, Al-Momani F, Meqdam MM, Saadoun I & Mohammad MJ. Detection of Genetic Polymorphism by RAPD-PCR among Isolated of *Bacillus thuringiensis*. *New Microbiol.* 1999; 22(3): 241-247.
- Manasherob R, Zaritsky E, Ben-Dov E, Saxena D, Barak D & Einav M. Effect of accessory proteins P19 and P20 on cytolytic activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 2001; 43:355-364.
- Margalit J & Dean D. The Story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 1985; 1: 1-7.
- Masson L, Erlandson M, Puzstai-Cary M, Brousseau R, Juarez-Perez, V & Frutos R. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64(12): 4782-4788.
- McClelland M & Welsh J. DNA Fingerprinting by Arbitrarily Primed PCR. *PCR Methods Appl.* 1994; 4: S59-S65.
- McGaughey WH & Whalon ME. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 1992; 258:1451-1455.
- Mohammed SI, Johnson DE & Aronson AI. Altered binding of the Cry1Ac toxin to larval membranes but not to the toxin-binding protein in *Plodia interpunctella* selected for resistance to different *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62:4168-4173.
- Molly DP. Impact of the black fly (Diptera:Simuliidae) control agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on chironomids (Diptera:Chironomidae) and other non target insects: results of ten field trials. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1992; 8: 24-31.
- Moran CP. RNA polymerase and transcription factors. In: Sonenshein AL, Hoch JA & Losick R. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 1993. 653-667p.

Morse RJ, Yamamoto T & Stroud RM. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 2001; 9: 409-417.

Mullis KB. Process for amplifying nuclei acid sequences. US Patent 1987; 4.683.202.

Muthukumar G & Nickerson KW. The glycoprotein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* indicates a lectinlike receptor in the larval mosquito gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987; 53: 2650-2655.

Nakanishi K, Yaoi K, Nagino Y, Hara H, Kitami M, Atsumi S et al Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FESB Lett.* 2002; 519: 215-220.

NCBI = National Center for Biotechnology Information. [on line]. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Brower/wwwtax.cgi> [acesso em set 2004].

N.C.C.L.S. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved Standards M 2-A3. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

Nilsson J, Svensson B, Ekelund K & Christiansson A. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998; 27: 168-172.

Norris JR. The classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 1964; 27:439-447.

Norris JR & Burges HD. Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects epizootiological applications. *J. Insect Pathol.* 1963; 5: 460-472.

Oakey HJ, Ellis JT, Gibson LF. Differentiation of *Aeromonas* genomospecies using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *J. Appl. Bacteriol.* 1996; 80: 402-410.

Oddou P, Hartmann H & Geiser M. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 1991; 202: 673-680.

Ogunjimi AA, Gbenle GO, Olukoya DK & Akinrimisi EO. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil samples in Nigeria. *Z. Naturforsch* 2000; 55(11-12): 987-990.

Ohba M & Aizawa K. Sorological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invert. Pathol.* 1978; 32:303-309.

Oliveira EJ, Rabinovitch L, Monnerat RG, Passos LKJ & Zahner V. *Brevibacillus laterosporus*: molecular characterization and potential in biological control. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; *in press*.

Oliveira EJ, Silva SEA & Rabinovitch L. A standardized protocol for the rapid detection of gelatin hydrolysis by *Bacillus sphaericus*. *Israel J Entomol.* 1998; 32: 141 –146.

Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D & Mcgaughey WH. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:23473-23476.

Orduz S, Realpe M, Arango R, Murillo LA & Delecluse A. Sequence of the Cry11Bb11 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1998; 1388 (1): 267-272.

- Osmolo EO & Thomson JA. Cloning and expression of a *Bacillus thuringiensis* (L1-2) gene encoding a crystal protein active against *Glossina morsitans morsitans* and *Chilo partellus*. *Curr. Microbiol.* 1997; 34: 118-121.
- Pao-Intara M, Angsuthanasombat C & Panyim S. The mosquito larvicida activity of 130 kDa delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* resides in the 72 kDa amino-terminal fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 153: 294-300.
- Pattanayak D, Chakrabarti SK, Kumar PA & Naik PS. Characterization of genetic diversity of some serovars of *Bacillus thuringiensis* by RAPD. *Indian J. Exp. Biol.* 2001; 39(9): 897-901.
- Pinto LMN, Azambuja AO, Diehl E & Fiúza LM. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). *Braz. J. Biol.* 2003; 63(2): 301-306.
- Poncet S, Anello G, Delécluse A, Klier A & Rapoport G. Role of the Cry IVD polypeptide in the overall toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 3928-3930.
- Poncet S, Delécluse A, Klier A & Rapoport G. Evaluation of synergistic interactions among the Cry IVA, Cry IVB and Cry IVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Inv. Pathol.* 1995; 66: 131-135.
- Pootanakit K, Angsuthanasombat C & Panyim S. Identification of two isoforms of aminopeptidase N in *Aedes aegypti* larval midgut. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2003; 36(5): 508-513.
- Porcar M & Juárez-Pérez V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol. Reviews* 2003; 26: 419-432.
- Porter AG, Davidson EW & Liu JW. Mosquitocidal toxins of *Bacilli* and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Reviews* 1993; 57: 838-861.
- Porter AG. Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. *Parasitol. Today* 1996; 12: 175-179.
- Priest FG. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 1992; 72: 357-369.
- Priest FG, Kaji DA, Rosato YB & Canhos VP. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiology* 1994; 140 (5): 1015-1022.
- Promdonkoy B & Ellar DJ. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 2000; 350: 275-282.
- Promdonkoy B, Chewawiwt N, Tanapongpipat S, Luxananil P & Panyim S. Cloning and characterization of a cytolytic and mosquito larvicidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. *Curr. Microbiol.* 2003; 46: 94-98.
- Rabinovitch L, Jesus FF, Cavados CFG, Zahner V, Momen H, Silva MHL, Dumanoir CV, Frachon E & Lecadet MM. *Bacillus thuringiensis* subsp. *oswadocruzi* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *brasiliensis*, two novel Brazilian strains which determine new serotype H38 and H39, respectively. *Mem. Ins. Osw. Cruz* 1995; 90 (1): 41-42.

- Ragni A, Thiéry I & Delécluse A. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to the H-14 serotype. *Curr. Microbiol.* 1996; 32:48-54.
- Rajamohan F, Alcantara E, Lee MK, Chen XJ, Curtiss A & Dean DH. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1995; 177:2276-2282.
- Ravoahangimalala O & Charles J-F. *In vitro* binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *FEBS Lett.* 1995; 362: 11-115.
- Ravoahangimalala O, Charles JF & Schoeller-Raccaud J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae Diptera: Culicidae. *Res. Microbiol.* 1993; 144:271-278.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C & Charles J-F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Tren. Parasitol.* 2001; 17(8): 377-380.
- Restrepo N, Gutierrez D, Patiño MM, Thiéry I, Delécluse A & Orduz S. Cloning, Expression and Toxicity of a Mosquitocidal Toxin Gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Men. Inst. Osw. Cruz* 1997; 92 (2): 257-262.
- Rezsöhazy R, Hallet B & Delcour J. IS231D, E and F, three new insertion sequences in *Bacillus thuringiensis*: extension of the IS231 family. *Mol. Microbiol.* 1992; 6:1959-1967.
- Rezsöhazy R, Hallet B, Mahillon J & Delcour J. IS231V and W from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, two distant members of the IS231 family of insertion sequences. *Plasmid* 1993; 30:141-149.
- Rivera AMG, Granum PE & Priest FG. Common occurrence of enterotoxins genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis* FEMS Microbiol Lett. 2000; 190: 151-155.
- Rivera AMG & Priest FG. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 2003; 26: 254-261.
- Rodcharoen J, Mulla MS Chaney JD. Microbiol larvicides for the control of nuisance aquatic midges (Diptera:Chironimidae) inhabiting mesocosms and manmade lakes in California. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1991; 7:56-62.
- Ronimus RS, Parker LE, Morgam, HW. The Utilization of RAPD-PCR for Identifying Thermophilic and Mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 147: 75-79.
- Rosato YB, Gonçalves ER, Tahara ST & Mehta A. Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. In: Serafini LA, Barros NM & Azevedo JL. *Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria.* EDUCS – Editora da Universidade de Caxias do Sul; 2002. 73-100p.
- Rosso LM & Delécluse A. Contribution of the 65-Kilodalton Protein Encoded by the Cloned Gene *cry19A* to the Mosquitocidal Activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 4449-4455.
- Rohlf FJ. *NTSYS-PC: Numerical Taxonomy for System for the IBM PC Microcomputer*, Setauket, New York: Applied Biostatistics, Inc.; 2002.

Ronimus RS, Parker LE, Morgam, HW. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. FEMS Microbiol Lett. 1997; 147: 75-79.

Rosato YB, Gonçalves ER, Tahara ST & Mehta A. Diagnóstico molecular de doenças em plantas: detecção de fitopatógenos bacterianos. In: Serafini LA, Barros NM & Azevedo JL. Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria. EDUCS – Editora da Universidade de Caxias do Sul; 2002. 73-100p.

Rosso LM & Delécluse A. Contribution of the 65-Kilodalton Protein Encoded by the Cloned Gene *cry19A* to the Mosquitocidal Activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 4449-4455.

Ruas-Neto A & Oliveira CM. Controle biológico de culicídeos e simulídeos: inseticidas bacterianos. Rev. Bras. Malariol. D. Trop. 1985; 37: 61-75.

Ruiz LM, Segura C, Trujillo J & Orduz S. In vivo binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004; 99(1) 73-79.

Salamitou S, Agaisse H, Bravo A & Lereclus D. Genetic analysis of *cryIIIa* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. Microbiology 1996; 142:2049-2055.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. 3rd Volume, 1989.

Sankaranarayanan, R., Sekar K, Banerjee R, Sharma V, Surolia A & Vijayan M. 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold. Nat. Struct. Biol., 3: 596-603.

Sangadala S, Walters FS, English LH & Adang MJ. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+$ - K^+ efflux *in vitro*. J. Biol. Chem. 1994; 269:10088-10092

Santos BS 2000. Estudo de Doze Sorovares de *Bacillus thuringiensis*: Atividade Larvicida, Curva de Crescimento, Determinação da Presença de Genes Cry4A/B Utilizando a PCR e Variabilidade Genômica Observada por AP-PCR. MSc. Thesis, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 131p.

Sasaki J, Asano S, Hashimoto N, Lay B-W et al Characterization of a *cry2A* gene cloned from an isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto*. Curr. Microbiol. 1997; 35: 1-8.

Schnepf E, Crickmori N, Van-Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62: 775-806.

Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR & Denholm I. Insect resistant transgenic plants. Trends in Biotechnology 1998; 16: 168-175.

Selander RK, Caugant DA, Ochaman H, Musser JM, Gilmour MN & Whittan TS. Methods of multilocus enzymes electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ Microbiol. 1986; 51: 873-884.

Sekar V. The insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Curr. Microbiol.* 1988; 17:347-349.

Shevelev AB, Lewitin E, Novikova SI, Wojciechowska YA, Usacheva EA, Chestukhina GG & Stepanov VM. A New PCR-based Approach to a Fast Search of a Wide Spectrum of Cry Genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998; 45(6): 1265-1271.

Shida O, Takagi H, Kadowaki K & Komagata K. Proposal for two genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; 46: 939-946.

Shimizu T & Morikawa K. The β -prism: a new folding motif. *Trends Biochem. Sci.* 1996; 21:3-6.

Silva SEA 2002. Análise da Variabilidade Genética Através de Eletroforese de Multilocus Enzimáticos e Perfil de Resistência a Antimicrobianos em *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*. MSc. Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 151p.

Sneath PHA. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Sneath PHA, Priest FG, Goodfellow M & Todd G. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986, vol. 1, 5-7p.

Stephan R. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genomic fingerprinting of *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 1996; 31: 311-316.

Stephan R, Schraft H & Untermann F. Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA). *Let. Appl. Microbiol.* 1994; 18: 260-263.

Sudheesh PS, Jie K & Xu H. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from shrimps. *Aquac.* 2002; 207: 11-17.

Svenson B, Eneroth A, Brendehang J & Christiansson J. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *Int. Dairy J.* 1999; 9: 903-912.

Swaminathan B & Mattar GM. Molecular typing methods. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC & White TJ. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles e Aplications*. ASM Press: Washington, D.C.; 1993. 642p.

Tabashnik BE. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58: 3342-3346.

Tabashnik BE, Finson N, Groeters FR, Moar WJ, Johnson MW, Luo K & Adang MJ. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:4120-4124.

Thomas WE & Ellar DJ. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *FEBS Lett.* 1983; 154: 362-368.

Thorne L, Garduno F, Thompson T et al Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". *J. Bacteriol.* 1986; 166: 801-811.

Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH & Bulla Jr, LA. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:5490-5494.

Valadares-Inglis MCC, Shiler W & DeSouza MT. Engenharia genética de microrganismos de agentes de controle biológico. In: Mello LS & Azevedo JL. Controle Biológico. Jaguariuna: Embrapa; 1998. 201-230p.

Valaitis AP, Lee MK, Rajamohan RF & Dean DH. Brush border membrane aminopeptidase N in the gypsy moth serves as the receptor for the CryIAC δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. 1995; 25: 1143-1151.

Valaitis AP, Jenkins JI, Lee MK, Dean DH & Garner KJ. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2001; 46: 186-200.

Van Rie J & Ferré J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. In: Charles J-F, Delécluse A & Nielsen-LeRoux C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. 219-232p.

Van Rie J, Jansens S, Höfte H, Degheele D & Van Mellaert H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. Eur. J. Biochem. 1989; 186:239-247.

Van Rie J, Jansens S, Höfte H, Deghelle D & Van Mellaert H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta- endotoxins. Appl. Environ. Microbiol., 1990; 56: 1378-1385.

Vasconcelos FJM & Rabinovitch L. A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in food. J. Food Microbiol. 1994; 58(3): 235-238.

Visser B. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strains". Fems Microbiol. Lett. 1989; 58: 121-124.

Undeen A & Nagel W. The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR60A strain (Goldberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. Mosq. News 1978; 38: 524-527.

Waalwijk C, Dullemans A, Wieggers G & Smith P. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis* against tipulid larvae. J. Appl. Ent. 1992; 114:415-420.

Ward ES & Ellar DJ. Assignment of the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to specific plasmid by curing analysis. FEBS Lett. 1983; 158: 45-49.

Warren GW, Koziel MG, Mullins MA et al Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. Novartis, 1998; US Patent 5770696.

Weiser JA. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. Zentralblatt für Mikrobiologie 1984; 139: 57-60.

Welsh J & McClelland M. Fingerprintings genomas using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 1990; 18: 7213-7218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". Nucleic Acids Res. 1990; 18: 6531-6535.

Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA & Tingey SV. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 1993; 218: 704-740.

Wipfli MS, Merritt RW & Taylor WW. Low toxicity of the black fly larvicide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to early stages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*), brown trout (*Salmo trutta*), and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) following direct and indirect exposure. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1994; 51: 1451-1458.

Wirth MC, Georghiou GP, Walton WE & Federici BA. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J. Med. Entomol.* 2000a; 37(4): 534-540.

Wirth MC, Federici BA & Walton WE. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 2000b; 66 (3):1093-1097.

Wirth MC, Georghiou GP & Federici BA. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1997; 94: 10536-10540.

Wolfersberger MG. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 1990; 46:475-477.

Woodburn MA, Yousten AA, Hilu KH. Random amplified polymorphic DNA-fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 212-217.

Wu D & Chang FN. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* 1985; 190: 232-236.

Wu D & Federici BA. A 20-kilodalton protein preserve cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 1993; 175:5276-5280.

Wu D, Johnson JJ & Federici BA. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 1994; 13:965-972.

Yamagiwa M, Kamauchi S, Okegawa T, Esaki M, Otake K, Amachi T et al. Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical microvilli of larval midgut of *Culex pipiens*. *Biosc. Biotech. Biochem.* 2001; 65(11): 2419-2427.

Yamamoto T & Dean DH. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: Charles J-F, Delécluse A & Nielsen-LeRoux C. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. 81-96p.

Yamamoto T & Iizuka T. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983; 227: 233-241.

Yoshida K, Matsushima Y, Sen K, Sakai H & Komano T. Insecticidal activity of a peptide containing the 30th to 695th amino acid residues of the 130-kDa protein of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53: 2121-2127.

Yu, C-G, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG & Estruch JJ. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelial cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63:532-536.

Yu J, Tan L, Liu Y & Pang Y. Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* based on PCR amplified fragment polymorphisms of flagellin genes. *Curr. Microbiol.* 2002; 45: 139-143.

Yuan Z, Hansen BM, Andrup L & Eilenberg J. Detection of enterotoxin genes in mosquito-larvicidal *Bacillus* species. *Curr. Microbiol.* 2002; 45(3): 221-225.

Zahner V 1992. Análise Isoenzimática de Algumas Espécies Entomopatogênicas de *Bacillus* (Isoenzyme Analysis of Some Species of Entomopathogenic *Bacillus*). MSc. Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, 130p.

Zahner V, Rabinovitch L, Cavados CFG & Momen H. Multilocus enzyme electrophoresis on agarose gel as an aid to the identification of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* strains". *J. Appl. Bacteriol.* 1994; 76:327-335.

Zahner V, Rabinovitch L & Momen H 1989. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 1989; 67: 275-282.

Zahner V, Rabinovitch L, Suffys P & Momen H. Genetic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65 (11): 5182-5185.

