



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E SEQUENCIAMENTO DE
ENTEROTOXINAS (HBL, NHE e BceT) DE LINHAGENS DE *B.*
thuringiensis ISOLADAS NO ESTADO DO AMAZONAS**

MARCOS CÉZAR FERNANDES PESSOA

**MANAUS/AM
2009**

MARCOS CÉZAR FERNANDES PESSOA

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E SEQUENCIAMENTO DE
ENTEROTOXINAS (HBL, NHE e BceT) DE LINHAGENS DE *B.*
thuringiensis ISOLADAS NO ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito na obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Saúde.

Orientadores: Dr. Spartaco Astolfi Filho (UFAM)

Dra. Thania Verginia Guaycurus (FIOCRUZ-RJ)

MANAUS/AM

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E SEQUENCIAMENTO DE
ENTEROTOXINAS (HBL, NHE e BceT) DE LINHAGENS DE *B.*
thuringiensis ISOLADAS NO ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito na obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Saúde.

Dissertação defendida e aprovada em 15 de Julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Spartaco Astolfi Filho (UFAM)

Dra. Thania Verginia Guaycurus (FIOCRUZ/RJ)

Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA)

Dra. Patrícia P. Orlandi Nogueira (FIOCRUZ/AM)

Aos meus pais e irmãos que muito me ajudaram e aos mestres e amigos que sempre acreditaram em meu potencial, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sua infinita sapiência e amor por ter dado a mim forças e perseverança de continuar e, assim, concluir este trabalho;

Aos meus orientadores, **Dra. Thania Verginia Guaycurus** (“segunda mãe”) pelos seus ensinamentos, conselhos, lições no fazer Ciência e por ter acreditado em meu potencial desde o início do mestrado e pelo **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**, por seus conselhos nos trabalhos de PCR e sequenciamento, principalmente quando estes insistiam em não dar certo;

Aos meus pais, **Esperidião Batista Pessoa** e **Maria Célia Fernandes Pessoa**, que sempre estiveram e estão presentes em minha vida. Agradeço por toda a zelosa educação moral e cristã que dedicaram a mim, e que fizeram construir o ser humano que hoje sou;

Aos meus irmãos, em especial a **Wendell, Regina, Eldenora** e **Márcio** por terem dado todo o apoio necessário nesta caminhada;

A **Enedina Nogueira** por seus auxílios na PCR e Sequenciamento;

A **Livio Figueiredo** por sua colaboração nas análises das sequências;

A **Rogério das Neves** e **Jonso Souza** pelo apoio que me deram no laboratório;

A **Anilton Souza Filho** por ter me auxiliado no início dos meus experimentos em laboratório e por ter fornecido as linhagens de *Bacillus thuringiensis*;

À professora **Antônia de Souza** que com sua boa vontade sempre esteve pronta a colaborar no que fosse possível;

Aos meus **colegas de turma** do curso de Mestrado pela confiança e amizade;

Aos meus colegas de faculdade, especialmente, **Catarina, Wanderli, Lídia, Romilda, Kleyciane, Euder, Ivonete e Rosalena** pelo companheirismo e apreço e pelos muitos momentos felizes que passamos juntos;

À minha amiga e ex-colega de faculdade, **Lídia Nascimento de Souza** e ao meu amigo **André Mendes** por terem dado uma “forcinha” com o seu notebook, a fim de que pudesse terminar a redação desta dissertação;

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual não poderia levar adiante o mestrado;

À **Universidade Federal do Amazonas** pela oportunidade em oferecer o curso de Mestrado e por dispor o Laboratório de Tecnologias de DNA, no qual eu desenvolvi minha pesquisa.

Enfim, meus sinceros votos de agradecimento a todos e muito obrigado por tudo!!!

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

|Albert Einstein

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva comumente utilizada no controle de vetores de doenças tropicais e pragas da agricultura. Apesar de seu uso tanto na agricultura quanto em saúde humana, esta bactéria pode ser produtora de enterotoxinas que estão presentes também em algumas linhagens de *Bacillus cereus*, destacando-se a enterotoxina não-hemolítica (NHE), a hemolisina BL (HBL) e a enterotoxina T (BceT), que têm sido relacionadas a surtos de intoxicação alimentar relatados na literatura. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar genotipicamente estas enterotoxinas em 100 linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas, bem como realizar o seqüenciamento destes genes de enterotoxinas a partir do produto da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A prevalência dos genes destas enterotoxinas nas estirpes de *B. thuringiensis* pelo método de PCR foi relativamente alta, cujos resultados para os sete genes pesquisados (*bceT*, *hblA*, *hblD*, *hblC*, *nheA*, *nheB* e *nheC*) mostraram-se distintos entre si. Pelo perfil genotípico foram determinados 27 grupos e ficou evidenciado que 41% das linhagens deram positivas para todos os genes de enterotoxinas, enquanto que 3% foram negativas para todos os genes estudados. A análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das linhagens de *B. thuringiensis* amazônicas identificou similaridades com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos que estão depositadas no banco de dados do GenBank/EMBL.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, enterotoxinas, perfis genotípicos.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium commonly used in the tropical disease vectors and agriculture pragues control. Despite of its use both agriculture and human health, this bacterium can be enterotoxins producer that are also present in a few *Bacillus cereus* strains, emphasizing the non-haemolytic enterotoxin (NHE), haemolysin BL (HBL) and enterotoxin T (BceT) that have been related to food poisoning outbreaks reported in the literature. Thereby, this work had as a purpose to identify and to realize a genotypic characterization of these enterotoxins in one hundred *B. thuringiensis* strains isolated in the Amazon State, as well as to achieve the sequencing of these enterotoxin genes starting from the product of Polymerase Chain Reaction (PCR). The prevalence of these enterotoxin genes in *B. thuringiensis* strains by PCR method was relatively high, of which the results for the seven genes researched (*bceT*, *hblA*, *hblD*, *hblC*, *nheA*, *nheB* and *nheC*) showed different between themselves. By the genotypic profile were determined 27 groups and was evidenciated that 41% of the strains were positives for all the enterotoxin genes, whereas 3% were negatives for all the genes studied.. The analysis of the nucleotides and amino acids sequences of the Amazonian *B. thuringiensis* strains identified similarities with the nucleotides and amino acids sequences that are deposited in the GenBank and EMBL databases.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, enterotoxins, genotypic profiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: <i>Bacillus thuringiensis</i> observado por microscopia de contraste de fase.....	21
Figura 02: Esquema do mecanismo de ação da proteína cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> em larvas de insetos.....	23
Figura 03: <i>Bacillus cereus</i> observado por coloração de Gram.....	24
Figura 04: Estrutura em cristalografia da enterotoxina B estafilocócia.....	26
Figura 05: Estrutura em cristalografia do componente de ligação (B) da hemolisina BL de <i>B. cereus</i>	27
Figura 06: Modelos de homologia dos componentes NheB e NheC. Os modelos foram criados com base na estrutura cristal do componente B de HBL. As estruturas protéicas são mostradas no formato ribbons com as folhas- β em azul marinho.....	29
Figura 07: Mapa do Estado do Amazonas com as regiões de coleta em destaque.....	37
Figura 08: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 640pb resultante da amplificação do gene <i>bceT</i> nas linhagens de <i>B. thuringiensis</i> . M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de <i>B. thuringiensis</i> isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. Bra – controle negativo.....	49
Figura 09: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 640pb resultante da amplificação do gene <i>bceT</i> nas linhagens de <i>B. thuringiensis</i> . M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de <i>B. thuringiensis</i> isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. Bra – controle negativo.....	49
Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 360pb resultante da amplificação do gene <i>hblA</i> nas linhagens de <i>B. thuringiensis</i> . M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de <i>B. thuringiensis</i> isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. Bra – controle negativo.....	51
Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de	

360pb resultante da amplificação do gene *hblA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....51

Figura 12: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 410pb resultante da amplificação do gene *hblD* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....53

Figura 13: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 410pb resultante da amplificação do gene *hblD* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....53

Figura 14: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 730pb resultante da amplificação do gene *hblC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....54

Figura 15: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 730pb resultante da amplificação do gene *hblC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....55

Figura 16: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 479pb resultante da amplificação do gene *nheA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....56

Figura 17: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 479pb resultante da amplificação do gene *nheA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....56

Figura 18: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 753pb resultante da amplificação do gene *nheB* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....57

Figura 19: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 753pb resultante da amplificação do gene *nheB* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....58

Figura 20: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 563pb resultante da amplificação do gene *nheC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....59

Figura 21: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% evidenciando um fragmento de 563pb resultante da amplificação do gene *nheC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M – marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Relação das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> isoladas no Estado do Amazonas.....	38
Tabela 02: Linhagem padrão de referência para a análise de PCR.....	39
Tabela 03: Iniciadores de PCR usados para detectar os genes de enterotoxinas em linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	41
Tabela 04: <i>Grid</i> de temperatura utilizado no gradiente para verificar a temperatura de anelamento dos pares de iniciadores.....	42
Tabela 05: Reagentes utilizados para a reação de seqüenciamento.....	44
Tabela 06: Identificação e caracterização genotípica de enterotoxinas apresentada pelas 100 linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	60
Tabela 07: Perfis genotípicos e classificação genotípica das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> , conforme a amplificação por PCR.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BceT – Enterotoxina T de *Bacillus cereus*
- BGSC – *Bacillus Genetic Stock Center*
- BLAST – *Basic Local Alignment Sequence Tool*
- °C - grau Celsius
- CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Da – Dalton
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- dNTP – desóxinucleotídeo trifosfato
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- et al* – e outros autores
- EBI – *European Bioinformatics Institute*
- EMBL – *European Molecular Biology Laboratory*
- g - grama
- h - hora
- HBL – hemolisina BL
- Hold* – tempo de espera
- Kb - quilobase
- kDa – quilodalton
- LB – meio de cultura Luria-Bertani
- M – molar
- MEGA 4.0 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*
- MEME – *Multiple EM for Motif Elicitation*
- mg - miligrama
- MgCl₂ – Cloreto de magnésio
- min - minuto
- mL - mililitro
- mM - milimolar
- NaCl – Cloreto de sódio
- ng - nanograma

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NHE – Enterotoxina não-hemolítica

ORF – *Open reading frame*

p/v – peso por volume

pb – pares de base

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

Pfam – *Protein Families Databases*

pH – potencial hidrogeniônico

pMOL - picomol

RFLP – Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotação por minuto

s – segundos

SAP – *Srimp Alkaline Phosphatase*

Taq DNA Polimerase – DNA Polimerase de *Thermus aquaticus*

TBE – Tris/Borato/EDTA

Tm – *melting temperature* (temperatura de fusão)

U/μL – unidade por microlitro

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UFC – unidade formadora de colônia

UnB – Universidade de Brasília

μg - micrograma

μL - microlitro

V - volume

VP – *Vascular Permeability*

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
EPÍGRAFE.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
2.2 <i>Bacillus cereus</i>	24
2.3 ENTEROTOXINAS.....	25
2.3.1 Hemolisina BL.....	27
2.3.2 Enterotoxina NHE.....	29
2.3.3 Enterotoxina T.....	30
2.4 Síndromes transmitidas por alimentos relacionadas com as enterotoxinas.....	31
2.5 Técnicas moleculares aplicadas a <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i>	33
2.5.1 A técnica de PCR na detecção de genes de enterotoxinas expressas por <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i>	33
2.5.2 Sequenciamento de DNA e aplicação em <i>B. cereus</i> e <i>B. thuringiensis</i>	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Mapa dos locais de coleta.....	37
4.2 Linhagens amazônicas de <i>B. thuringiensis</i> usadas no trabalho.....	37
4.3 Linhagem bacteriana padrão.....	38
4.4 Ativação das linhagens de <i>B. thuringiensis</i>	39
4.5 Morfologia celular.....	39
4.5.1 Preparações a fresco.....	39
4.5.2 Esfregaços corados pela técnica de Gram (CONN <i>et al.</i> , 1957).....	40
4.6 Extração de DNA genômico.....	40
4.6.1 Método de extração de DNA por fervura e congelamento sucessivos.....	40
4.7 Iniciadores utilizados na técnica de PCR.....	41
4.8 Condições de PCR.....	41
4.8.1 Protocolo de PCR.....	41

4.8.2 Gradiente de temperatura dos iniciadores (segundo WALLACE <i>et al.</i> , 1979)....	42
4.8.3 Condições de amplificação por PCR.....	42
4.8.4 Eletroforese em gel de agarose.....	43
4.8.5 Procedimentos para condições de corrida.....	43
4.9 Seqüenciamento.....	43
4.9.1 Tratamento com Exo/SAP.....	43
4.9.2 Protocolo de reação de seqüenciamento.....	44
4.9.3 Condições de ciclagem.....	44
4.9.4 Precipitação da reação de seqüenciamento.....	45
4.9.5 Análise de seqüenciamento e caracterização genotípica.....	45
4.10 Meios de cultura, corantes, tampões, enzimas e marcadores.....	46
4.10.1 Meios de cultura.....	46
4.10.1.1 Ágar LB.....	46
4.10.1.2 LB Líquido.....	47
4.10.2 Coloração de Gram.....	47
4.10.2.1 Reagentes da coloração de Gram.....	47
4.10.3 Tampões.....	48
4.10.3.1 Tampão de eletroforese TBE 10X.....	48
4.10.3.2 Tampão de amostra de eletroforese TBE 5X.....	48
4.10.4 Enzimas.....	48
4.10.5 Marcadores de massa molecular.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Enterotoxina BceT (gene <i>bceT</i>).....	49
5.2 Enterotoxina HBL.....	50
5.2.1 Componente B (gene <i>hblA</i>).....	50
5.2.2 Componente L ₁ (gene <i>hblD</i>).....	52
5.2.3 Componente L ₂ (gene <i>hblC</i>).....	54
5.3 Enterotoxina NHE.....	55
5.3.1 Componente A (gene <i>nheA</i>).....	55
5.3.2 Componente B (gene <i>nheB</i>).....	57
5.3.3 Componente C (gene <i>nheC</i>).....	58
5.4 Perfis genotípicos das linhagens de <i>B. thuringiensis</i> amplificadas para os genes de enterotoxinas.....	60
5.5 Seqüenciamento dos amplicons dos genes de enterotoxinas.....	65
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	73
8. PERSPECTIVAS.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

ANEXOS.....	86
ANEXO 01: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>bceT</i>	87
ANEXO 02: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>hblA</i>	90
ANEXO 03: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>hblD</i>	95
ANEXO 04: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>hblC</i>	98
ANEXO 05: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>nheA</i>	103
ANEXO 06: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>nheB</i>	107
ANEXO 07: Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>nheC</i>	110
ANEXO 08: Alinhamento em modo similaridade das sequências de aminoácidos do componente L ₁ da hemolisina BL.....	114
ANEXO 09: Alinhamento em modo similaridade das sequências de aminoácidos do componente L ₂ da hemolisina BL.....	116
ANEXO 10: Alinhamento em modo similaridade das sequências de aminoácidos do componente A da enterotoxina NHE.....	118

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada no solo e desde a descoberta de sua atividade inseticida no início do século XX, esta bactéria tem sido usada mundialmente no controle de pragas da agricultura e de vetores transmissores de doenças tropicais como dengue e malária (PERANI *et al.*, 1998).

Segundo Jensen *et al.* (2002) a estreita relação entre *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus* foi confirmada. Na prática, somente a presença de cristal intracelular com atividade inseticida em *B. thuringiensis* distingue as duas espécies. Estes cristais intracelulares são tóxicos para certas espécies de invertebrados, especialmente as larvas de insetos pertencentes às ordens *Coleoptera*, *Diptera* e *Lepidoptera*.

Entretanto, ambas as espécies de *Bacillus* são compostas por muitas linhagens com potencial variado que podem causar efeitos adversos em humanos, desde infecções gastrointestinais até infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos conforme relatado recentemente por Ghelardi *et al.* (2007).

Devido a isso, linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de produzir uma variedade de substâncias tóxicas que são praticamente as mesmas expressas pelo patógeno oportunista *B. cereus*. Assim como este patógeno, *B. thuringiensis* de posse destas toxinas poderá apresentar algum risco para a saúde humana. Contudo, somente relatos esporádicos de casos clínicos têm sido publicados (WHO, 1999).

Na literatura tem-se referência que algumas linhagens de *B. thuringiensis* apresentam enterotoxinas que são compostas pela hemolisina BL (HBL), pela enterotoxina não hemolítica (NHE) e pela enterotoxina T (BceT ou bc-D-ENT), e que são codificadas pelos genes *hbl*, *nhe* e *bceT*, respectivamente.

Estas mesmas enterotoxinas são produzidas por linhagens de *B. cereus* e têm sido relatadas por estarem envolvidas em surtos de intoxicação alimentar do tipo diarréica, notadamente as enterotoxinas NHE (LUND e GRANUM, 1996; GRANUM *et al.*, 1999) e HBL (BEECHER e MACMILLAN, 1991; BEECHER *et al.*, 1995) que apresentam muitos casos relatados na literatura e, por isso, são as que mais possuem estudos publicados.

A enterotoxina HBL é uma hemolisina tricomponente que consiste de dois componentes líticos, L₁ e L₂ (codificados pelos genes *hblD* e *hblC*, respectivamente), e uma proteína de ligação B, codificada por *hblA*. NHE é também uma proteína tricomponente, porém sem atividade hemolítica, sendo codificada por três genes (*nheA*, *nheB* e *nheC*). Estas

toxinas estão organizadas em operons e seus genes são transcritos juntos e ordenadamente (THAENTHANEE *et al.*, 2005; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2006). Enquanto isso, a toxina BceT é uma proteína única que foi relatada por Agata *et al.* (1995) por apresentar atividades biológicas típicas de enterotoxinas que estão envolvidas em surtos de intoxicação alimentar do tipo diarréica.

O método de PCR é extremamente sensível. Ele pode detectar uma única molécula de DNA numa amostra. Mesmo traços de RNA podem ser analisados da mesma maneira, desde que sejam previamente transcritos para DNA com transcriptase reversa (ALBERTS *et al.*, 1997). Devido a isso, este método tem sido muito utilizado para a detecção dos genes de enterotoxinas em linhagens de *Bacillus* que portam estes genes.

Um outro método que vem sendo muito utilizado nos estudos dos genes de enterotoxinas de linhagens de *Bacillus* é o seqüenciamento de DNA, de modo a determinar a homologia que as seqüências de nucleotídeos destes *Bacillus* apresentam com seqüências já conhecidas. Segundo Alberts *et al.* (1997), este método permite a determinação, de forma simples e rápida, da seqüência nucleotídica de qualquer fragmento de DNA purificado.

Em consequência disso, este trabalho teve como objetivo, por análise de PCR, detectar e identificar os genes codificadores destas enterotoxinas, determinar e classificar os perfis genotípicos nas linhagens amazônicas de *B. thuringiensis*, assim como o seqüenciamento nucleotídico e de proteína de alguns genes enterotóxicos de interesse, visto que, futuramente, este trabalho poderá viabilizar a montagem de um *kit* de diagnóstico molecular para a detecção destas enterotoxinas em novos isolados bacterianos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Família *Bacillaceae*) (Figura 01) é uma bactéria em forma de bastonete Gram-positivo, anaeróbico facultativo, dotado de flagelo peritríquio, células com aproximadamente 1 µm de largura por 3 a 5 µm de comprimento. É uma bactéria formadora de esporos cilíndricos a elípticos, não deformantes, com posição central a subterminal no esporângio. As células vegetativas ocorrem isoladas, aos pares e em cadeia (BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

Este bacilo apresenta como característica importante a síntese de cristal protéico entomopatogênico que aparece por ocasião do II ao III estágio da esporogênese e que representa cerca de 20 a 30% do peso seco da célula esporulada (ARONSON *et al.*, 1986).

Em 1901, Ishiwata identificou um bacilo patogênico para larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) denominando-o de *Bacillus sotto* que posteriormente foi classificado como *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* (ISHIWATA, 1901).

A mesma bactéria foi isolada por Berliner (1915) a partir de larvas doentes de traças da farinha (*Ephesthia kuniella*) da estação para processamento de grãos em Berlim. O nome *Bacillus thuringiensis* foi dado por Berliner em homenagem à cidade de Thuringen (Alemanha).

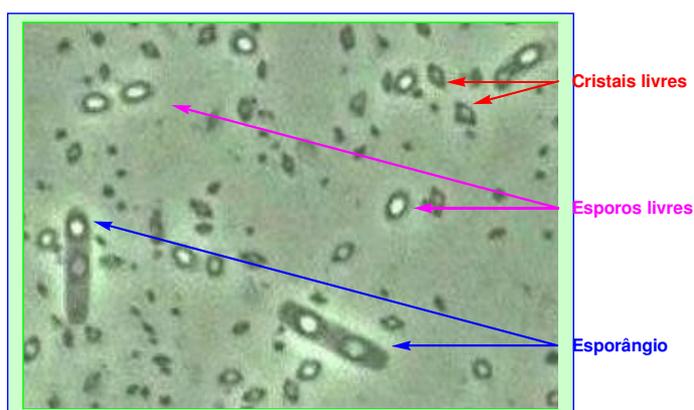


Figura 01: *Bacillus thuringiensis* observado por microscopia de contraste de fase.

Fonte: Souza-Filho, 2005.

Taxonomicamente, *B. thuringiensis* pertence a um grupo denominado *B. cereus*. Este grupo inclui ainda *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B.*

weihenstephanensis (DAFFONCHIO *et al.*, 2000). O grupo *B. cereus* consiste de bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes, móveis e formadoras de esporos (BRILLARD e LERECLUS, 2004). No caso de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, estes microrganismos apresentam características bioquímicas similares, mas somente *B. thuringiensis* produz cristais entomotóxicos durante o início da esporulação que o diferencia de *B. cereus* (POLANCZYK *et al.*, 2004; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2005).

B. thuringiensis pode se multiplicar em ambientes favoráveis como, por exemplo, insetos-alvo e solos ricos em nutrientes (ARONSON e SHAI, 2001). Diferentes isolados de *B. thuringiensis*, oriundos de várias partes do mundo demonstram um largo espectro de ação inseticida específico para diferentes ordens de insetos como *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* e *Hymenoptera* (GUAYCURUS, 1991; BRAVO *et al.*, 1998; KAO *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2003; KUBOTA *et al.*, 2006).

No início da esporulação, *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade entomocida. Estas proteínas, chamadas de proteínas Cry, vão se acumulando e formam uma inclusão paracristalina, também chamada de proteína cristal ou δ -endotoxina (ASANO *et al.*, 1997; RICE, 1999).

As toxinas Cry são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto a porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal. Estes genes *cry* podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (POLANCZYK e ALVES, 2003).

Crickmore *et al.* (1998) propuseram, pela primeira vez, uma classificação para as toxinas Cry expressas por *B. thuringiensis* baseada somente nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Por outro lado, Kao *et al.* (2003) citam que o desenvolvimento de um sistema de classificação deve estar baseado na especificidade da toxina e na homologia das seqüências de aminoácidos. Uma revisão destas classificações baseada na produção de δ -endotoxinas foi descrita em trabalhos de Bravo *et al.* (1998) e Rice (1999). Mais de 250 genes *cry* foram seqüenciados e agrupados em 40 grupos de toxinas Cry. A revisão da nomenclatura da toxina Cry está disponível em: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html (SONG *et al.*, 2003).

O modo de ação inseticida das δ -endotoxinas é sofisticado em termos moleculares, demonstrando alta especificidade e extrema toxicidade. As etapas no processo de ação bioinseticida estão bem relatadas nas revisões de Polanczyk e Alves (2003), Polanczyk *et al.* (2004) e Barreto (2005) como descritas abaixo:

Após a ingestão do cristal, produzido por *B. thuringiensis*, pelo inseto-alvo, as δ -

endotoxinas, ainda sob a forma de protoxinas, são solubilizadas em pH alcalino do intestino médio e através da atuação de enzimas proteolíticas, as protoxinas são clivadas e transformam-se em frações tóxicas. Essas toxinas hidrolisadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. No momento que essas toxinas se ligam aos receptores, ocorre uma provável mudança na conformação tridimensional do peptídeo. Conseqüentemente, formam-se poros que aumentam a permeabilidade da membrana e que possibilitam o vazamento de íons. Adicionalmente, ocorre o aumento na absorção de água, causando turgescência e destruição das células do intestino médio. Devido a isso, o inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, o mesmo para de se alimentar. Estes mesmos dados corroboram com as informações descritas na revisão de outros autores (TOJO e AIZAWA, 1983; DU *et al.*, 1994; KNOWLES, 1994; SANGADALA *et al.*, 1994; GAZIT e SHAI, 1995; LIGHTWOOD *et al.*, 2000; KAO *et al.*, 2003;) (Vide figura 02).

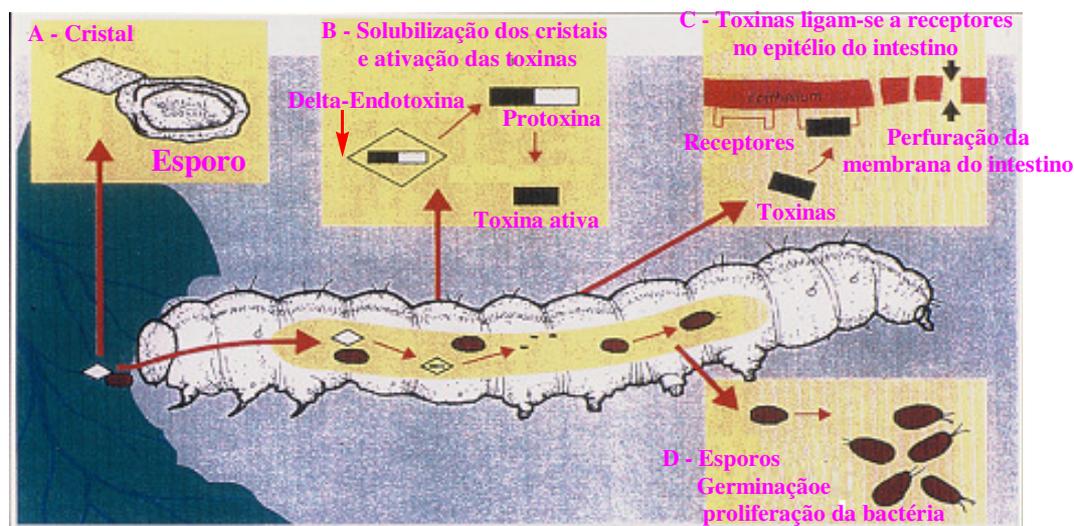


Figura 02: Esquema do mecanismo de ação da proteína cristal de *Bacillus thuringiensis* em larvas de inseto.

Fonte: Souza-Filho, 2005.

Os genes codificadores das toxinas de *B. thuringiensis* estão largamente empregados na construção de plantas transgênicas como o fumo, tomate e milho. Isto é compreensível, visto que, atualmente, mais de 62 milhões de hectares distribuídos pelo mundo abrangem culturas transgênicas que produzem toxinas inseticidas a partir desta bactéria (DANSON *et al.*, 2006).

Os avanços recentes na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem diferenciar cepas e isolados e podem também ser empregados para determinar a presença ou ausência de determinados genes *cry*.

A reação de PCR no estudo de *B. thuringiensis* pode ser empregada com a finalidade de prever as atividades inseticidas (CAROZZI *et al.*, 1991), identificar os tipos de genes (CERON *et al.*, 1995), determinar a distribuição dos genes (CHAK *et al.*, 1994) e detectar novos genes, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (KUO e CHAK, 1996; BRAVO *et al.*, 1998; GUAYCURUS, 1999; PORCAR e JUÁREZ-PÉREZ, 2003).

A técnica de PCR descrita por Mullis e Faloona (1987) tem sido utilizada em combinação com a técnica de Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP), onde o produto de amplificação é clivado com enzimas de restrição e o padrão de bandas obtidos em géis, determina os tipos de genes *cry* presentes na linhagem ou identifica a ocorrência de novos tipos de genes (GUAYCURUS, 1999; BARRETO, 2005).

2.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus (Figura 03) é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, formadora de esporos comumente encontrada no solo, e que apresenta motilidade através de flagelos peritríquios (ASANO *et al.*, 1997; CÂMARA, 2002; MENDES *et al.*, 2004).



Figura 03: *Bacillus cereus* visto por coloração de Gram.

Fonte: <http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php>

B. cereus pode multiplicar-se bem em uma faixa de temperatura de 10° C a 48° C,

sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 28° C a 35° C. Todavia, Mäntynen e Lindström (1998) ressaltam que linhagens de *B. cereus* podem crescer em temperaturas que variam entre 4° C e 37° C, e que linhagens psicrotólicas podem produzir enterotoxinas tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbica facultativa.

Esta bactéria é frequentemente isolada do leite cru e de seus derivados como um contaminante o qual, como outras bactérias, produz uma grande quantidade de enzimas proteolíticas que digerem a caseína causando sabor anormal ou odor no leite (ASANO *et al.*, 1997).

Além de degradar produtos lácteos, algumas amostras de *B. cereus* podem produzir enterotoxinas extracelulares que levam a surtos de intoxicação alimentar, ocasionando vômito e diarreia (GUAYCURUS *et al.*, 1987; ASANO *et al.*, 1997).

B. cereus é encontrado em outros ambientes causando contaminação como vegetais, cereais, condimentos, carne bovina, suína e de frango, sopas, pratos à base de vegetais e arroz cozido (GUAYCURUS *et al.*, 1983; MENDES *et al.*, 2004).

B. cereus pode ocasionar infecções oculares, ceratite grave, endoftalmite e panoftalmite. *B. cereus* também tem sido associado a infecções localizadas e infecções sistêmicas, incluindo endocardite, meningite e pneumonia. Além disso, pode provocar formação de abscessos, bacteremia, septicemia, infecção no rim e trato urinário e sepsia puerperal (BEECHER e WONG, 1994, JAWETZ *et al.*, 1998).

2.3 ENTEROTOXINAS

As enterotoxinas (Figura 04) são proteínas de cadeia simples compostas por uma quantidade relativamente grande de lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Os pesos moleculares oscilam entre 28.000 a 35.000 daltons.

As enterotoxinas afetam as células que revestem o trato gastrointestinal e como resultado as células epiteliais secretam grandes quantidades de líquidos e eletrólitos (íons). Estas proteínas produzidas por algumas espécies bacterianas é a causa mais comum da intoxicação alimentar (TORTORA *et al.*, 2000).

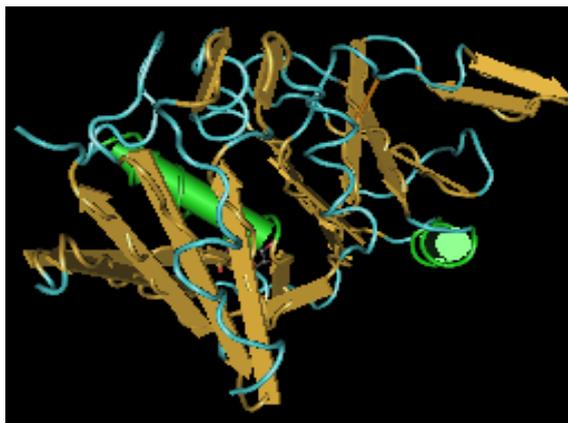


Figura 04: Estrutura em cristalografia da enterotoxina B estafilocócica.

Fonte: Swaminathan *et al.* (1995).

As enterotoxinas, diferente das endotoxinas, são toxinas liberadas por um determinado microrganismo no intestino. Geralmente as enterotoxinas são frequentemente citotóxicas e destroem células pela alteração da permeabilidade das células epiteliais da parede intestinal. Elas são, na maioria das vezes, formadoras de poros, secretadas pelas bactérias, que se reúnem para formar poros nas membranas celulares e, com isso, ocasionar a lise e morte celular.

A morte das células que formam uma barreira entre o lúmen intestinal e o tecido que as circundam, causa fluido intersticial, que é composto por água e eletrólitos sendo que o vazamento deste material para dentro do trato intestinal causa a diarreia (<http://en.wikipedia.org/wiki/Enterotoxin>). As contrações musculares normais são alteradas, levando a uma diarreia intensa que pode ser acompanhada de vômitos. As enterotoxinas que podem ocasionar vômitos são conhecidas como toxinas eméticas (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2005).

Alguns microrganismos secretam enterotoxinas, tais como *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori* e algumas amostras de *Bacillus cereus* (MOSS, 1987; PINTO, 1996).

Cepas de *Staphylococcus aureus* também produzem uma enterotoxina que afeta os intestinos, causando vômitos e náusea quando ingerida e, por isso, é denominada de enterotoxina estafilocócica. Algumas estirpes de *S. aureus* produzem enterotoxinas que resultam nos sintomas associados à síndrome do choque térmico (TORTORA *et al.*, 2000).

Do mesmo modo, *Vibrio cholerae* produz uma enterotoxina denominada toxina colérica. Assim como a toxina diftérica, a toxina colérica consiste de dois polipeptídeos, A (ativo) e B (de ligação). A enterotoxina termolábil (mais sensível ao calor que a maioria das

toxinas), produzidas por algumas linhagens de *Escherichia coli*, tem uma ação idêntica à da toxina colérica (TORTORA *et al.*, 2000).

As intoxicações alimentares produzidas pelas enterotoxinas constituem-se em um problema mundial e tem uma estreita relação com os hábitos alimentares regionais. Madegowda *et al.* (2008) propuseram, por cristalografia de raio-X, o modelo estrutural do componente de ligação (B) da hemolisina BL (HBL) de *Bacillus cereus* (Figura 05).

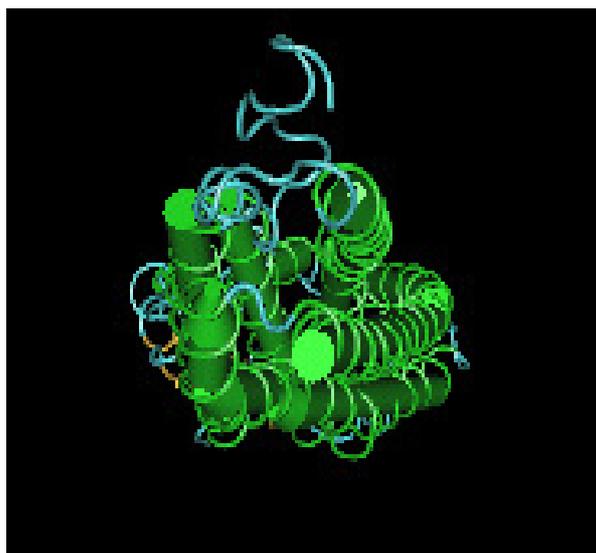


Figura 05: Estrutura em cristalografia do componente de ligação (B) da hemolisina BL de *B. cereus*.

Fonte: Madegowda *et al.* (2008).

Guaycurus *et al.* (1993) descreveram pela primeira vez no Brasil, a presença de proteínas extracelulares (enterotoxinas) produzidas por *B. cereus* AL-42 e AL-15, amostras isoladas de surtos de intoxicação alimentar no Rio de Janeiro. Através do fracionamento por cromatografia em QAE-Sephadex e Sephadex G75 ficou demonstrado no último processo cromatográfico a presença de três picos. O pico principal apresentou atividade de permeabilidade vascular em coelhos, letalidade para camundongos e citotoxicidade para células Vero e Hela. Pela análise por SDS-PAGE, após ultracentrifugação, ficou confirmado que esta enterotoxina era um composto de massa molecular maior que 30.000 daltons.

Em algumas cepas de *B. cereus* as enterotoxinas estão relacionadas com toxinas conhecidas como hemolisina BL (HBL), enterotoxina não-hemolítica (NHE) e enterotoxina bc-D-ENT (BceT).

2.3.1 HEMOLISINA BL

As hemolisinas são substâncias que se enquadram no grupo das citolisinas e que fazem a degradação das hemácias (JAWETZ *et al.*, 1998). As bactérias produzem hemolisinas que diferem em sua capacidade de lisar diferentes tipos de hemácias (humanas, de ovelhas e coelhos, por exemplo) e no tipo de lise que elas causam. Produtores importantes de hemolisinas são os estafilococos, *Clostridium perfringens* – agente causal mais comum da gangrena gasosa –, estreptococos e algumas cepas de *B. cereus* (TORTORA *et al.*, 2000).

O operon hemolisina BL (HBL) consiste de quatro genes, mas somente os produtos de três destes genes foram caracterizados (McKILLIP, 2000). Este complexo é composto por três proteínas, B, L₁ e L₂, transcritas pelos genes *hblC* (codificador de L₂) *hblD* (codificador de L₁) e *hblA* (codificador do componente B), e que estão organizados em um operon único junto com um quarto gene, o *hblB*, codificador da proteína B' (HEINRICHS *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 1997; GUINEBRETIERE *et al.*, 2002). A toxina HBL possui atividade hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e de permeabilidade vascular (SERGEEV *et al.*, 2006).

Em acordo com estes autores Kotiranta *et al.* (2000) reportam que a toxina HBL é composta de um componente de ligação, B, e dois componentes líticos, L₁ e L₂, e ela requer todos os três componentes para a atividade máxima hemolítica, citotóxica, dermonecrótica e permeabilidade vascular, assim como acumulação de fluidos em alça ileal ligada de coelhos.

Os tamanhos dos componentes da hemolisina BL foram relatados como tendo 35, 36 e 45 kDa para B, L₁ e L₂, respectivamente. De qualquer modo, o peso molecular varia consideravelmente de gel para gel. O componente B do complexo HBL de *B. cereus*, em cultura de eritrócitos, sensibiliza lentamente estas células para que a ação lítica dos componentes L se dê mais rapidamente, porém o componente B em alta concentração diminui o efeito lítico dos componentes L, fato este pouco compreendido (BEECHER e WONG, 1994).

No estudo de Hansen e Hendriksen (2001), foram estudadas linhagens de *B. cereus*, das quais foram caracterizadas a hemolisina HBL contendo três componentes de proteína: um componente de ligação B e dois componentes líticos L₁ e L₂, sendo estes mesmos componentes descritos por Beecher e Wong (1994). Os três genes, *hblA*, *hblC* e *hblD*, foram detectados por PCR em 11 das 22 linhagens de *B. cereus* estudadas.

De acordo com Trabulsi *et al.* (1999), hemolisinas também são recorrentes em *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Em *S. aureus*, são caracterizadas pelo menos quatro hemolisinas. A mais comum, em amostras de origem humana, é a alfa, que é tóxica para plaquetas humanas e letal para animais, quando inoculadas por via sistêmica. A

hemolisina beta (betalisina) é mais ativa sobre hemácias de carneiro e tem atividade de esfingomielinase. Em *L. monocytogenes*, as hemolisinas juntamente com a fosfolipase C rompem a membrana fagossomal, permitindo o patógeno escapar para o citoplasma da célula hospedeira, onde se multiplica usando seus nutrientes.

2.3.2 ENTEROTOXINA NHE

As enterotoxinas são proteínas que causam citotoxicidade, acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de animais experimentais e dermonecroses, sendo letais para camundongos e citotóxicas em culturas de células Vero (MÄNTYNEN e LINDSTRÖM, 1998; NOTERMANS e BATT, 1998).

O complexo NHE é composto por três proteínas, NheA, NheB (figura 06) e NheC (figura 06), com massa molecular de 45, 39 e 105 kDa, respectivamente, e são codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (HANSEN e HENDRIKSEN, 2001). Estes genes estão organizados em forma de operon (GUINEBRETIÈRE *et al.*, 2002). Neste complexo estão identificados dois possíveis fatores líticos e um fator de ligação codificados pelo operon que contém os genes codificadores desta enterotoxina (SERGEEV *et al.*, 2006).

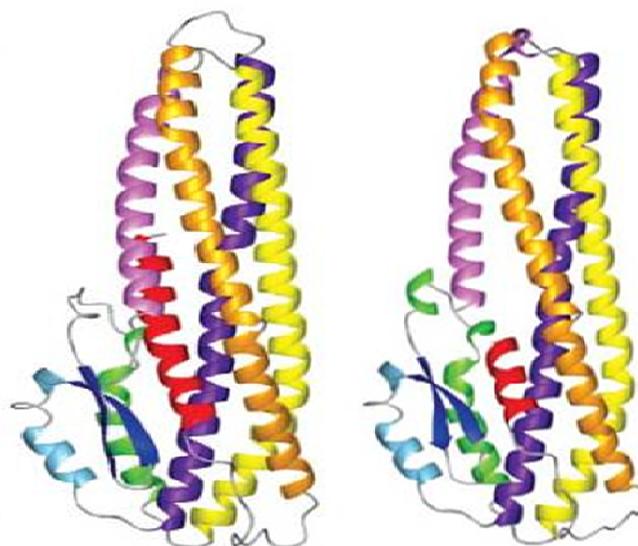


Figura 06: Modelos de homologia dos componentes NheB e NheC. Os modelos foram criados com base na estrutura cristal do componente B de HBL. As estruturas protéicas são mostradas no formato ribbon com as folhas- β em azul marinho.
Fonte: Fagerlund *et al.* (2008).

Em *B. cereus* a enterotoxina não-hemolítica (NHE) é uma das duas enterotoxinas

tricomponentes responsável pela síndrome da intoxicação alimentar diarréica causada por esta espécie do gênero *Bacillus*. Não obstante, a enterotoxina NHE foi originalmente identificada em uma linhagem de *B. cereus* responsável por um surto de intoxicação alimentar (BRILLARD e LERECLUS, 2004).

Na Noruega, Lund e Granum (1996), identificaram a enterotoxina NHE na linhagem *B. cereus* NVH 0075/95, sendo que esta amostra não continha os genes *hbl* e *cytK*, mas apresentava atividade citotóxica, permitindo assim a descoberta do gene *nhe*.

Os estudos posteriores, conduzidos por Ehling-Schulz *et al.* (2005) e Fagerlund *et al.* (2008), indicaram que esta enterotoxina não era hemolítica. Segundo Kotiranta *et al.* (2000), esta enterotoxina que consiste de três proteínas possui similaridade com a enterotoxina HBL. A enterotoxina NHE é codificada por três genes *nhe* (*A*, *B* e *C*) que são necessários para atuarem juntos, a fim de que possa ocorrer a atividade enterotóxica (LINDBÄCK *et al.*, 2004).

Hansen e Hendriksen (2001) detectaram os genes desta enterotoxina em 13 de 22 linhagens de *B. cereus* estudadas. Neste mesmo estudo três linhagens portaram somente um gene e uma linhagem não apresentou nenhum dos três genes.

2.3.3 ENTEROTOXINA T

B. cereus é uma bactéria responsável por ocasionar dois diferentes tipos de gastroenterites em humanos. A capacidade de *B. cereus* em causar diarréia é também atribuída pela produção de uma enterotoxina, a enterotoxina diarréica de *B. cereus* – denominada bc-D-ENT ou simplesmente BceT.

Agata *et al.* (1995) informaram que a bc-D-ENT foi capaz de causar acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de coelhos, alterou a permeabilidade vascular da epiderme de porquinhos-da-índia, levando o tecido a sofrer necrose, e mostrou citotoxicidade em cultura de células Vero. Estes dados foram observados primeiramente no estudo desenvolvido por Shinagawa *et al.* (1991).

De acordo com Agata *et al.* (1995), o produto do gene é uma proteína única, sendo que o DNA correspondente para este gene foi detectado por PCR em todas as linhagens de *B. cereus* examinadas e, com base nestes resultados, seria possível que isolados de *B. cereus* de alimentos ou do solo pudessem ser agentes causadores da intoxicação alimentar do tipo diarréica.

A BceT como uma proteína única é responsável por efeitos enterotóxicos de *B. cereus*

e esta proteína possui peso molecular de 45 kDa com atividades biológicas típicas de enterotoxinas (KOTIRANTA *et al.*, 2000).

O gene da toxina (*bceT*) em um fragmento de DNA de *B. cereus* B-4ac com 2,9 kb foi clonado e expresso em *Escherichia coli* sendo determinada a sua seqüência de nucleotídeos. O fragmento de DNA conteve uma fase de leitura aberta (ORF) capaz de codificar um polipeptídeo de 336 aminoácidos com massa molecular de 41.039 Da. O produto traduzido em *E. coli* exibiu citotoxicidade em cultura de células Vero e foi positivo no ensaio de permeabilidade vascular. Também causou acúmulo de fluidos na alça ileal ligada de ratos e foi letal para camundongos submetidos à injeção intraperitoneal. Estas atividades biológicas são consideradas características de enterotoxinas diarréicas.

Portanto, de acordo com o estudo de Agata *et al.* (1995) este gene, denominado *bceT*, codificava uma das proteínas enterotóxicas de *B. cereus* que causa diarreia em síndromes decorrentes de intoxicação alimentar.

Entretanto, Granum *et al.* (1996) relataram que o gene *bceT* foi detectado somente em duas de sete linhagens de *B. cereus* isoladas de intoxicação alimentar e é incerto se esta proteína possui um papel nas infecções transportadas por alimentos. Isto foi sustentado por Ombui *et al.* (1997) que não encontraram nenhuma correlação entre a produção da enterotoxina testada imunologicamente e a presença do gene *bceT* em linhagens de *B. cereus* (GRANUM *et al.*, 1996; KOTIRANTA *et al.*, 2000).

2.4 Síndromes transmitidas por alimentos relacionadas com as enterotoxinas

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* são microrganismos ubíquos do solo e são considerados geralmente como contaminantes inofensivos. Contudo, algumas espécies são conhecidas como produtoras de toxinas, incluindo o patógeno de alimentos, *B. cereus*. A presença de isolados naturais de *Bacillus spp.* que abrigam um ou mais genes enterotóxicos e a subsequente demonstração das condições que podem levar à expressão da toxina, detém uma importância crucial na área de segurança de alimentos (McKILLIP, 2000).

Os fatores de virulência de *B. cereus* estão relacionados com a produção de várias toxinas extracelulares, entre elas uma toxina diarréica, mais precisamente um grupo de proteínas termolábeis, que é inativada em cinco minutos a 56° C e uma toxina caracterizada por um pequeno peptídeo termoestável de ação emética que se mantém inalterada após uma hora a 120° C (CÂMARA, 2002).

A toxina do tipo emético é pré-formada no alimento, enquanto a do tipo diarréico é,

provavelmente, produzida no trato intestinal, sendo que os fatores de virulência ainda não estão completamente caracterizados (GRANUM, 1994; MINNAARD *et al.*, 2001; GHELARDI *et al.*, 2002).

Este bacilo tem sido responsável por até 23% dos casos relatados na literatura de enfermidades oriundas de infecções alimentares (CÂMARA, 2002). Muitas linhagens de *Bacillus cereus* causam dois tipos principais de intoxicação alimentar, a emética e a diarréica (HANSEN e HENDRIKSEN, 2001).

A síndrome diarréica caracteriza-se por um período de incubação que varia de oito a dezesseis horas (NOTERMANS e BATT, 1998; MINNAARD *et al.*, 2001). Seus principais sintomas são diarréia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, raramente ocorrem náuseas e vômitos. A duração da doença é de doze a vinte e quatro horas, geralmente está associada ao consumo de alimentos de composição protéica contaminados, com aproximadamente 10^6 UFC/g (unidades formadoras de colônias/grama). Estes microrganismos podem fazer parte da flora fecal, dependendo do tipo de alimento e da sazonalidade, principalmente no verão, entretanto não coloniza o intestino, não persistindo por longos períodos (CÂMARA, 2002).

A síndrome diarréica é aparentemente causada por várias enterotoxinas. A enterotoxina melhor investigada é a HBL, uma hemolisina tricomponente que consiste de duas proteínas líticas (L_1 e L_2) e um componente de ligação (B) (BEECHER e MACMILLAN, 1991). Esta toxina, que possui atividades hemolíticas e dermonecroticas e aumenta a permeabilidade vascular, é considerada o fator de virulência primário em casos de diarréia por sua capacidade em causar acúmulo de fluidos na alça do íleo em coelhos (GHELARDI *et al.*, 2002).

Conforme relatado por Ehling-Schulz *et al.* (2006), enquanto a síndrome diarréica estaria relacionada com a enterotoxina não hemolítica (NHE), enterotoxina hemolítica (HBL) e com a citotoxina K (CytK), a síndrome emética seria ocasionada pela ação da toxina cereulida.

A síndrome emética caracteriza-se por um período de incubação curto, de uma a cinco horas, causando, em geral, mal-estar, vômitos e náuseas, sendo que o tempo de duração pode ser de seis a vinte e quatro horas de duração. Esta síndrome está associada a alimentos com alto teor de amido e que contenham número elevado de microrganismos viáveis de *B. cereus* (maior ou igual a 10^6 UFC/g) (CÂMARA, 2002; MENDES *et al.*, 2004). Quando grandes quantidades de arroz são cozidas e esfriadas lentamente, os esporos de *B. cereus* germinam, e os esporângios produzem a toxina durante a fase logarítmica de crescimento e algumas vezes durante a esporulação (JAWETZ *et al.*, 1998).

No que se refere a *B. thuringiensis* tem sido verificado que algumas estirpes deste bacilo possuem diversos fatores de virulência em comum com *B. cereus*, dentre estes destacando-se um complexo hemolítico e distintas enterotoxinas. Muitos destes fatores de virulência são regulados pela mesma proteína em ambas as espécies. O gene *entS* codifica, por exemplo, uma enterotoxina de 45-kDa que foi originalmente encontrada em *B. cereus*. Entretanto, a maioria dos isolados de *B. thuringiensis* estudados foram positivos para *entS* (GUTTMANN e ELLAR, 2000).

Han *et al.* (2006) estudando genes de virulência cromossomicamente codificados nas linhagens *B. thuringiensis* 97-27 e *B. cereus* E33L indicaram em seus resultados que ambas as linhagens compartilham um grupo de fatores de virulência comum aos membros do grupo *B. cereus*. Estes genes de virulência comuns incluem os três genes da enterotoxina não-hemolítica (*nheABC*), além de duas hemolisinas do tipo III formadoras de canal, uma perfringolisina O, uma fosfatidilinositol-específica e uma fosfatidilcolina, um fator sigma-B da RNA polimerase e uma protease extracelular da família p60. Estes últimos cinco genes são homólogos aos genes de virulência codificados pelo patógeno Gram-positivo *Listeria monocytogenes*. *B. thuringiensis* 97-27 e *B. cereus* E33L possuem também um gene codificador da citotoxina K, que foi anteriormente identificada em *B. cereus* (cepa ATCC 14579).

Vale ressaltar, no entanto, que na produção de um bioinseticida a base de *B. thuringiensis*, o que se utiliza é o cristal protéico e este é liberado após lise celular, ou seja, no último estágio da esporogênese. Já as enterotoxinas são produzidas durante a fase exponencial de crescimento, nos estágios iniciais da esporulação.

2.5 Técnicas moleculares aplicadas a *B. cereus* e *B. thuringiensis*

2.5.1 A técnica de PCR na detecção de genes de enterotoxinas expressas por *B. cereus* e *B. thuringiensis*

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes, desde que pelo menos parte de sua sequência nucleotídica já seja conhecida. Primeiro, a parte conhecida da sequência é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos, cada um complementar a uma das fitas da dupla hélice de DNA e posicionados em lados opostos da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores para a síntese de DNA *in vitro*

e determinam as extremidades do fragmento de DNA que é finalmente obtido (ALBERTS *et al.*, 1997).

A reação de PCR tem sido cada vez mais usada para a detecção de genes codificadores de enterotoxinas e tem provado ser um método rápido e sensível para a detecção destas linhagens bacterianas (HANSEN e HENDRIKSEN, 2001; GHELARDI *et al.*, 2002; GUINEBRETIERE *et al.*, 2002; AL-KHATIB *et al.*, 2007).

Hansen e Hendriksen (2001), descreveram em seus trabalhos que *B. thuringiensis* estaria envolvido em surtos de doenças gastrointestinais, e através de diferentes técnicas aplicadas, como a PCR e *kits* de diagnóstico molecular como Oxoid (para o componente L₂ de HBL) e Tecra Via (para a proteína NheA de NHE), ficou demonstrado que algumas linhagens eram capazes de produzir enterotoxinas e de possuírem genes que estão envolvidos em enteropatogêneses provocadas por *B. cereus*.

2.5.2 Seqüenciamento de DNA e aplicação em *B. cereus* e *B. thuringiensis*

Uma das técnicas mais importantes na biologia molecular é o seqüenciamento de DNA, pelo qual a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA pode ser determinada. Duas tecnologias diferentes foram desenvolvidas quase que simultaneamente – o método de terminação de cadeia por F. Sanger, no Reino Unido, e o método de degradação química por A. Maxam e W. Gilbert, nos Estados Unidos (BROWN, 2003).

Maxam e Gilbert (1977) desenvolveram uma técnica para o seqüenciamento em que o DNA pode ser seqüenciado por um procedimento químico que quebra parcialmente uma molécula de DNA terminalmente marcada em cada repetição de base. Os comprimentos dos fragmentos marcados então identificavam a posição dessas bases. As reações clivavam o DNA preferencialmente em adeninas, guaninas, citosinas e timinas de modo igual ou em citosinas somente. Quando os produtos destas quatro reações eram determinados pelo tamanho, eletroforese e gel de poliacrilamida, a seqüência de DNA era lida em bandas radioativas. A técnica na época permitiu o seqüenciamento de pelo menos 100 bases a partir do ponto de marcação com ³²P.

Na metodologia tradicional de Sanger *et al.* (1977) as moléculas com as cadeias terminadas que são sintetizadas mostram-se radioativamente marcadas e a seqüência de DNA é lida de uma auto-radiografia. A primeira molécula de DNA a ser completamente seqüenciada foi o genoma de 5.386 nucleotídeos do bacteriófago ΦX174, sendo seguida pelas seqüências do vírus SV40 (5.243 pb), em 1977, e do plasmídeo pBR322 (4.363 pb), em 1978.

O grupo de Sanger publicou a seqüência do genoma mitocondrial humano (16,6 kb) em 1981 e a do bacteriófago λ (49 kb) em 1982.

Diversos autores têm realizado estudos de seqüenciamento entre as bactérias do grupo *B. cereus* que expressam genes de virulência e que muitas vezes são codificados pelos mesmos genes nas espécies estudadas. Estes trabalhos incluem, rotineiramente, estudos com *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, a fim de verificar o grau de homologia que tais bacilos podem apresentar quanto aos genes de virulência expressos.

Deste modo, o trabalho de Granum *et al.* (1999) estabeleceu que o complexo NHE é codificado por um operon e os genes para cada subunidade foram clonados e seqüenciados. Os pesos moleculares e os genes para este complexo foram estabelecidos pelos autores como sendo o gene *nheA*, codificador da subunidade L₂ com 41 kDa, e o gene *nheB*, codificador da subunidade L₁ com 39,8 kDa. Semelhante ao panorama da hemolisina BL existe um gene adicional no operon NHE com uma função desconhecida (gene *nheC*). Este gene, entretanto, codifica uma proteína de 36,5 kDa que pode vir a ser um homólogo de *hblA*.

Segundo McKillip (2000) existe ainda uma similaridade significativa entre as seqüências de aminoácidos das proteínas HBL e NHE. De acordo com Granum *et al.* (1999), foi proposto que a proteína NheC seja um componente de ligação, tal qual o componente B da hemolisina BL (HBL).

No trabalho de Hansen e Hendriksen (2001) o gene *bceT* foi clonado e seqüenciado a partir da linhagem *B. cereus* B-4ac. Pela técnica de PCR, ficou estabelecido que este gene era amplamente distribuído entre as linhagens bacterianas. No entanto, o gene *bceT* variou na seqüência entre as linhagens estudadas, como ficou evidenciado por PCR, ao serem usados diferentes pares de iniciadores. E, das 22 linhagens de *B. cereus* estudadas, 10 não apresentaram o gene para a proteína BceT.

Atualmente, existem muitos trabalhos que fazem referência da estrita relação de *B. cereus* com *B. thuringiensis*, não apenas porque estas duas bactérias fazem parte do mesmo grupo de bactérias (grupo *B. cereus*), mas porque são produtoras de enterotoxinas que são freqüentemente recorrentes em surtos de intoxicação alimentar.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Pesquisar a presença dos genes codificadores das enterotoxinas utilizando a técnica de PCR, avaliar o perfil genotípico das linhagens de *Bacillus thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas e sequenciar estes genes.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Identificar os genes *hblA*, *hblC* e *hblD* do complexo HBL;
- Detectar os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* do complexo NHE;
- Determinar a presença do gene *bceT* codificador da enterotoxina BceT;
- Caracterizar os perfis genotípicos das enterotoxinas HBL, NHE e BceT das linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas;
- Realizar o seqüenciamento, a partir do produto de PCR, das linhagens de *B. thuringiensis* que amplificarem os genes de enterotoxinas;
- Fazer o alinhamento global das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos das linhagens que obtiverem um bom resultado de seqüenciamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Mapa dos locais de coleta

A figura 07 destaca as localidades do Estado do Amazonas onde foram realizadas as coletas para o isolamento de *B. thuringiensis*. As linhagens de *B. thuringiensis* encontram-se estocadas em meio SOFT, no Laboratório de Tecnologia do DNA Recombinante da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).



Figura 07: Mapa do Estado do Amazonas com as regiões de coleta em destaque.

Fonte: <http://www.guianet.com.br/am/mapaam.gif>

4.2 Linhagens amazônicas de *B. thuringiensis* usadas no trabalho

A tabela 01 lista as 100 linhagens de *Bacillus thuringiensis* que foram utilizadas neste estudo para a identificação e determinação dos genes codificadores das enterotoxinas, bem como a caracterização molecular destes genes.

Tabela 01: Relação das linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas.

1.BtAM 01	26.BtAM 30	51.BtAM 65	76.BtAM 118
2.BtAM 02	27.BtAM 31	52.BtAM 71	77.BtAM 119
3.BtAM 03	28.BtAM 32	53.BtAM 72	78.BtAM 120
4.BtAM 05	29.BtAM 33	54.BtAM 73	79.BtAM 121
5.BtAM 06	30.BtAM 34	55.BtAM 74	80.BtAM 122
6.BtAM 07	31.BtAM 35	56.BtAM 75	81.BtAM 124
7.BtAM 08	32.BtAM 36	57.BtAM 76	82.BtAM 129
8. BtAM 09	33.BtAM 37	58.BtAM 85	83.BtAM 131
9.BtAM 10	34.BtAM 38	59.BtAM 86	84.BtAM 133
10.BtAM 11	35.BtAM 39	60.BtAM 87	85.BtAM 134
11.BtAM 12	36.BtAM 40A	61.BtAM 89	86.BtAM 135
12.BtAM 13	37.BtAM 40B	62.BtAM 91	87.BtAM 136
13.BtAM 14	38.BtAM 40D	63.BtAM 94	88.BtAM 138
14.BtAM 15	39.BtAM 40E	64.BtAM 95	89.BtAM 142
15.BtAM 16	40.BtAM 41	65.BtAM 99	90.BtAM 143
16.BtAM 17	41.BtAM 47	66.BtAM 102	91.BtAM 144
17.BtAM 18	42.BtAM 49	67.BtAM 103	92.BtAM 153
18.BtAM 19	43.BtAM 50	68.BtAM 105	93.BtAM 154
19.BtAM 20	44.BtAM 53	69.BtAM 107	94.BtAM 155
20.BtAM 23	45.BtAM 54	70.BtAM 108	95.BtAM 156
21.BtAM 24	46.BtAM 55	71.BtAM 111	96.BtAM 158
22.BtAM 25	47.BtAM 57	72.BtAM 112	97.BtAM 159
23.BtAM 26	48.BtAM 60	73.BtAM 113	98.BtAM 161
24.BtAM 27	49.BtAM 61	74.BtAM 116	99.BtAM 162
25.BtAM 28	50.BtAM 63	75.BtAM 117	100.BtAM 165

4.3 Linhagem bacteriana padrão

A amostra padrão *B. cereus* ATCC 14579 foi utilizada como controle positivo pelo fato de amplificar, na reação de PCR, com todos os genes enterotóxicos (Tabela 02).

Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Dr. Bjarne Munk Hansen, do Departamento de

Ecologia Microbiana e Biotecnologia da Dinamarca, por intermédio da Dra. Thania Guaycurus.

Tabela 02: Linhagem padrão de referência para a análise de PCR.

Amostra	Complexo HBL			Complexo NHE			BceT
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>
<i>B. cereus</i> ATCC 14579 (BGSC 6A5)	+	+	+	+	+	+	+

4.4 Ativação das linhagens de *B. thuringiensis*

Para a ativação destas linhagens foi feito o inóculo em meio LB Líquido (item 4.10.1.2) e, após 24 horas, o plaqueamento foi realizado em meio Ágar LB (item 4.10.1.1) com a finalidade de obter colônias puras de *B. thuringiensis*.

4.5 Morfologia celular

Inicialmente a morfologia bacteriana, assim como a pureza da cultura foi determinada tanto nas preparações a fresco, não coradas, e examinadas sob microscopia de contraste de fase, bem como em esfregaços corados pelo método de Gram (item 4.10.2) observados sob a microscopia de imersão.

4.5.1 Preparações a fresco

a) Procedimentos

Com uma alça descartável foi depositada, em uma lâmina de vidro, uma gota das suspensões bacterianas com 24, 48 e 72 horas de crescimento em Ágar LB (item 4.10.1.1) à temperatura de 32° C +/- 2 °C. A lâmina foi coberta com a lamínula e foi feita a observação sob microscopia de contraste de fase.

b) Interpretação

Nestas preparações foi visualizada a mobilidade, formas vegetativas, esporângio, esporos dominantes, assim como a presença de cristais.

4.5.2 Esfregaços corados pela técnica de Gram (CONN *et al.*, 1957)

a) Procedimentos

Em uma lâmina de vidro foi feito um esfregaço homogêneo, fixado ao calor. A lâmina foi coberta com o Reagente 1 (item 4.10.2.1), deixando agir por um minuto. Lavou-se a lâmina rapidamente em água corrente. O esfregaço foi tratado com o Reagente 2 (item 4.10.2.1) por um minuto, e descorado com etanol absoluto ou álcool/acetona. Em seguida, a lâmina foi lavada rapidamente em água corrente. Depois foi utilizado o Reagente 3 (item 4.10.2.1), deixando agir por 30 segundos. Enfim, a preparação foi seca à temperatura ambiente.

b) Interpretação

A observação dos caracteres morfotintoriais das células bacterianas foi efetuada pela coloração de Gram. A bactéria foi considerada Gram-positiva quando sua célula apresentou a cor violeta escuro. Quando a bactéria apresentou coloração rosa foi considerada Gram-negativa.

4.6 Extração de DNA genômico

Com o propósito de obter DNA de fita simples que foram utilizados como molde nas reações de PCR, foi adotado o seguinte protocolo:

4.6.1 Método de extração de DNA por fervura e congelamento sucessivos (STARNBACH *et al.*, 1989, modificado por GUAYCURUS, 1999):

Das amostras do estoque, uma alça foi transferida para um tubo de LB líquido e incubada na temperatura de 37°C por 24h. Da cultura bacteriana crescida em meio líquido, uma alça foi plaqueada sobre a superfície sólida do LB ágar. A placa foi invertida e incubada na temperatura de 37°C por 16-18h. A pureza da cepa bacteriana foi investigada de acordo com a morfologia celular observada sob microscopia de contraste de fase. Uma alça com o crescimento bacteriano foi transferida para um microtubo contendo 500µL de H₂O MilliQ autoclavada e ressuspensa vigorosamente em homogeneizador (tipo vórtex – *Daigger Vortex Genie 2*). A suspensão foi centrifugada em minicentrífuga (*miniSpin-Eppendorf*) a 13.400 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 200µL de

H₂O MilliQ. A suspensão foi fervida a 100° C por 10 minutos em banho seco (*Dry Bath HC Control – Loccus Biotecnologia*). A amostra foi congelada a -20° C em freezer e descongelada à temperatura ambiente. Este último passo foi repetido duas vezes por se tratar de uma bactéria Gram-positiva.

4.7 Iniciadores utilizados na técnica de PCR

Para os genes codificadores das enterotoxinas (BceT, HBL e NHE) foram utilizados iniciadores, cujas sequências estão relacionadas na Tabela 03:

Tabela 03: Iniciadores de PCR usados para detectar os genes de enterotoxinas em linhagens de *B. thuringiensis*.

Iniciadores (sequência: 5'→ 3')	Tamanho (pb)
bceT F: CGT ATC GGT CGT TCA CTC GG bceT R: GTT GAT TTT CCG TAG CCT GGG	640 ⁽¹⁾
hblA F: GTG CAG ATG TTG ATG CCG AT hblA R: ATG CCA CTG CGT GGA CAT AT	360 ⁽²⁾
L1 F: AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT L1 R: CAC CAA TTG ACC ATG CTA AAT	410 ⁽³⁾
L2 F: AAT GGT CAT CGG AAC TCT AT L2 R: CTC GCT GTT CTG CTG TTA AT	730 ⁽³⁾
nheA F: TAC GCT AAG GAG GGG CA nheA R: GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT	479 ⁽⁴⁾
nheB F: CTA TCA GCA CTT ATG GCA G nheB R: ACT CCT AGC GGT GTT CC	753 ⁽⁴⁾
nheC F: CGG TAG TGA TTG CTG GG nheC R: CAG CAT TCG TAC TTG CCA A	563 ⁽⁴⁾

Fonte: ⁽²⁾Heinrichs *et al.* (1993); ⁽¹⁾Agata *et al.* (1995); ⁽³⁾Ryan *et al.* (1997); ⁽⁴⁾Granum *et al.* (1999).

4.8 CONDIÇÕES DE PCR

4.8.1 Protocolo de PCR

A reação de PCR seguiu o protocolo sugerido por Crump *et al.* (1999) com algumas modificações que foram estabelecidas no desenvolvimento deste trabalho. Esta reação consistiu de um volume final de 25 µL (2,5 µL de MgCl₂ [25mM]; 2,5 µL de dNTPs

[2,5mM]; 1,0 μL de cada iniciador [5pMol/ μL]; 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase [5 U/ μL]; 2,5 μL de Tampão 10X; 2 μL de DNA molde; e 13,2 μL de H_2O *MilliQ*).

4.8.2 Gradiente de temperatura dos iniciadores (segundo WALLACE *et al.*, 1979)

A diferença de temperatura dos oligonucleotídeos foi estabelecida através da técnica de gradiente, com base no cálculo da temperatura média de fusão, cujo objetivo foi eliminar bandas inespecíficas. Esta técnica consiste em submeter iguais misturas reacionais a diferentes temperaturas, tendo como temperatura média a T_m calculada para cada iniciador. As temperaturas referentes ao *grid* foram determinadas automaticamente pelo termociclador numa escala de 1 a 12 (tabela 04). O gradiente foi realizado em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) sob as condições discriminadas abaixo:

Desnaturação inicial	95 °C	2 min
Desnaturação	94 °C	1 min
Anelamento	58 °C	1 min
Polimerização	72 °C	1 min
Extensão final	72 °C	5 min
<i>Hold</i>	4 °C	~
Total de Ciclos	30	

Tabela 04: *Grid* de temperatura utilizado no gradiente para verificar a temperatura de anelamento dos pares de iniciadores:

1 – 50,9 °C	5 – 54,8 °C	9 – 62,3 °C
2 – 51,1 °C	6 – 56,7 °C	10 – 63,8 °C
3 – 51,9 °C	7 – 58,6 °C	11 – 64,9 °C
4 – 53,2 °C	8 – 60,5 °C	12 – 65,5 °C

Nota: A temperatura de anelamento escolhida foi a do *grid* 7 (**58,6 °C**) por apresentar uma banda de melhor resolução no gel de agarose.

4.8.3 Condições de amplificação por PCR

O sistema de amplificação, após gradiente de temperatura (item 4.8.2), foi realizado em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf). As amplificações dos pares de iniciadores foram realizadas nas seguintes condições:

Desnaturação inicial	95 °C	4 min
Desnaturação	94 °C	30s
Anelamento	58 °C	45s
Extensão	72 °C	2 min
Extensão final	72 °C	3 min
<i>Hold</i>	4 °C	~
Total de Ciclos	30	

4.8.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada com a finalidade de separar e identificar fragmentos de DNA gerados na técnica de PCR. A concentração do gel de agarose esteve na faixa de 1% em tampão TBE 1X.

4.8.5 Procedimentos para condições de corrida

A cuba foi preparada utilizando os espaçadores e o pente. Uma quantidade necessária de agarose foi pesada para a preparação do gel, dependente do volume para uma concentração de 1% e transferiu-se o conteúdo para um *erlenmeyer*. Em água destilada o tampão TBE 10X foi diluído para uma concentração de 1X, em um volume final adequado ao volume do gel e transferido para o *erlenmeyer* contendo a agarose. Ele foi então levado ao microondas e aquecido até a total fusão da agarose. A solução foi esfriada até cerca de 55°C e, então, foi adicionado o corante brometo de etídio na concentração final de 1% (0,1-0,5 µg/mL) no gel. O gel foi vertido cuidadosamente na cuba, procurando-se não formar bolhas de ar. Ao final, o gel foi visualizado em transluminador de luz (*Ultraviolet Transluminator - Spectroline*) e fotografado para documentação.

4.9 Sequenciamento

4.9.1 Tratamento com Exo/SAP

A etapa do tratamento com as enzimas Exonuclease I e SAP (*Srimp Alkaline Phosphatase*) foi necessária para que as amostras das linhagens de *B. thuringiensis* obtivessem uma pureza no seu DNA, visto que seu material genético não foi extraído com *kits*

de purificação comerciais e, assim, as amostras pudessem ter um bom resultado durante o sequenciamento. O tratamento com Exo/SAP foi feito em termociclador conforme condições abaixo:

37°C	30 min	1X
80°C	15 min	1X
4°C	Indeterminado	

4.9.2 Protocolo de reação de seqüenciamento:

Para a reação de seqüenciamento foram necessários os seguintes reagentes:

- Pré-Mix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Bioscience).
- Iniciador *Forward* ou *Reverse* (5,0 pmoles/ μ L).
- Uso de água *MilliQ* autoclavada sendo o volume determinado após a análise do DNA pela eletroforese em gel de agarose.
- Microplaca (Placa para PCR 96 wells com borda-Sorenson Cód 23080)
- Adesivo selador (selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950)

Tabela 05: Reagentes utilizados para a reação de seqüenciamento.

Reação para um tubo	Volume (01tubo)	105*	Volume / Placa105
Pré - mix	2,0 μ L	X 105	220 μ L
Iniciador (5,0 pmoles/ μ L)	1,0 μ L	X 105	105 μ L
H ₂ O q.s.p	3,0 μ L	X 105	315 μ L
DNA (100 a 200 ng)	5,0 μ L	--	---

A reação foi preparada para 105 amostras a fim de corrigir qualquer erro de pipetagem. O mix foi preparado somente na hora em que foi utilizado, pois o mesmo é sensível à luz. Foram distribuídos 5 μ L do mix para cada poço da microplaca.

4.9.3 Condições de ciclagem:

95°C 25 s

95°C 15 s

50°C 20 s 30 ciclos

60°C 1min 20s.

4° C indeterminado

4.9.4 Precipitação da reação de seqüenciamento

Para 10,0 μL da reação foram usados: 1,0 μL de acetato de amônia; 27 μL etanol absoluto.

OBS: O acetato de amônio faz parte do *kit* de sequenciamento *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da Amersham Bioscience.

Precipitação

Após a adição de 1 μL de acetato de amônio em cada poço da placa, foi adicionado 27 μL de etanol absoluto 100 % MERCK, selou-se bem (*selador para placa SORENSON resistente a álcool Cód. 21950*) e, então, foi homogeneizado vigorosamente por 1 minuto (sendo isso um passo fundamental da precipitação). A placa foi incubada por 20 min a temperatura ambiente, protegida da luz e coberta com papel laminado. Centrifugou-se por 40 min a 4000 rpm a 4 °C. Após isso, a placa foi vertida e descartado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 120 μL de etanol 70% por poço, selando-se bem com o mesmo selo e homogeneizando por alguns segundos. A placa foi centrifugada por 10 min, na máxima velocidade de centrífuga, a 4 °C. Virou-se a placa e o conteúdo foi despejado, com força. Com a placa invertida foi dado um pulso de alguns segundos (não passando de 700 rpm) na centrífuga. Deixou-se secar a placa por 15 minutos até que o etanol fosse todo evaporado. Depois foi adicionado 10 μL de *Loading Buffer* homogeneizando muito bem (passo fundamental). Por fim, selou-se a placa com *Selador Thermal Seal Sealing Film PCR-COD. TS-321-31-101* (não resistente a álcool) centrifugando-se a mesma em um pulso de alguns segundos (não passando de 700 rpm).

4.9.5 Análise de seqüenciamento e caracterização genotípica

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se os iniciadores correspondentes aos produtos de PCR. Neste caso, foi utilizado o iniciador *forward* referente aos sete genes de enterotoxinas em estudo.

Foram obtidas um total de seis placas, sendo que destas seis placas, cinco eram completas com amostras dos genes de enterotoxinas e somente uma que foi em consórcio com outras amostras de trabalhos realizados no Laboratório de Tecnologia do DNA (UFAM).

Após análise das seqüências correspondentes às seis placas no seqüenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham Bioscience), obtiveram-se 169 seqüências

válidas, isto é, sequências que se encontravam apropriadas para análise, conforme a tarja verde que o *ScoreCard* das placas disponibilizava após o término do seqüenciamento das amostras no MEGA BACE 1000. Os resultados que saíam do seqüenciador automático MEGA BACE 1000 no formato ABD eram organizados em uma pasta zipada com o nome referente às enterotoxinas e data.

As pastas zipadas eram submetidas à análise no programa Phred do sítio da UnB (<http://helix.biomol.unb.br/phph/>). Os resultados obtidos no Phred e em condições de serem analisados foram marcados pelo próprio programa com uma tarja verde e sinal de “ok”. Em seguida, foram submetidas ao sítio do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), onde foi verificado o grau de homologia que as amostras apresentam em relação aos dados disponíveis no *GenBank*, por meio do BLASTN2 Sequence (para nucleotídeos) e BLASTX2 Sequence (para aminoácidos). As seqüências também foram analisadas no sítio EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>), comparando-as com o banco de dados do EMBL-EBI.

O alinhamento global foi feito na ferramenta CLUSTALW por meio do programa *CLC Sequence Viewer* versão 6.0 por se achar que este obtinha um resultado mais rápido e detalhado comparado com o MEGA. E, portanto, o programa *CLC Sequence Viewer* foi considerado para se fazer o alinhamento final das seqüências.

O resultado do CLUSTALW foi submetido ao programa *TeXShade*, o qual foi utilizado a fim de se fazer o trabalho de arte final das seqüências. Foram feitos os alinhamentos globais tanto das seqüências de DNA quanto das seqüências de aminoácidos.

A caracterização genotípica das linhagens estudadas foi feita de acordo com os perfis de amplificação que as linhagens de *B. thuringiensis* amazônicas apresentaram para cada gene analisado por PCR. Desta forma, foi montada uma matriz contendo os perfis apresentados, classificando cada linhagem nos seus devidos grupos genotípicos.

4.10 Meios de cultura, corantes, tampões, enzimas e marcadores

4.10.1 Meios de cultura:

4.10.1.1 ÁGAR LB

Extrato de levedura.....	5g
Peptona de caseína.....	10g
Cloreto de sódio.....	10g
Ágar bacteriológico.....	15g

Água destilada.....1000mL

4.10.1.2 LB LÍQUIDO

Extrato de levedura.....5g

Cloreto de sódio.....10g

Peptona de caseína.....10g

Água destilada.....1000mL

4.10.2 Coloração de Gram

4.10.2.1 Reagentes da coloração de Gram

Reagente 1- Cristal Violeta e Oxalato de Amônio

Solução A:

Cristal Violeta.....1g

Álcool etílico a 95%.....20mL

Solução B:

Oxalato de amônio.....0,8g

Água destilada.....80mL

* Misturar a Solução A com a Solução B.

Reagente 2- Lugol modificado

Iodeto de potássio.....2g

Água destilada.....300mL

Reagente 3- Contra-corante

Fucsina básica.....0,3g

Álcool etílico.....10mL

Fenol saturado.....5mL

Água destilada.....95mL

4.10.3 Tampões:

4.10.3.1 TAMPÃO DE ELETROFORESE TBE 10 X

Trisma-base.....	0,89M
Ácido Bórico.....	0,89M
EDTA.....	0,08M
pH.....	8,5

4.10.3.2 TAMPÃO DE AMOSTRA DE ELETROFORESE TBE 5 X

TBE.....	5X
Glicerol.....	30 % (p/v)
Azul de Bromofenol.....	0,05 % (p/v)

4.10.4 Enzimas:

Foram utilizadas as seguintes enzimas:

Exonuclease I.....	10U/ μ L
SAP.....	1U/ μ L
Taq DNA Polimerase I	5U/ μ L

4.10.5 Marcadores de massa molecular:

- Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).
- Gene Ruler™ 100pb DNA Ladder (Fermentas)
- 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5. RESULTADOS

Após a extração do DNA das linhagens de *B. thuringiensis*, foi preparada a reação de PCR com a finalidade de verificar a presença dos genes de enterotoxinas nestas linhagens. As reações de PCR foram realizadas em duas etapas, dividindo-se as linhagens em dois grupos de 50 amostras, porém os géis com os resultados obtidos para cada iniciador foram agrupados para cada gene como se seguirá abaixo. Cada grupo foi testado com os sete pares de iniciadores para os genes de enterotoxinas, tendo sempre como parâmetro a cepa *B. cereus* ATCC 14579 (padrão) e um controle negativo.

5.1 ENTEROTOXINA BceT (gene *bceT*)

Seguindo-se a PCR para controle da qualidade e integridade do DNA foi realizada a amplificação das 100 linhagens para verificar a presença do DNA da enterotoxina BceT, utilizando-se os iniciadores *bceTF* (*forward*) e *bceTR* (*reverse*) que amplificam para esta enterotoxina. As figuras 08 e 09 indicam as linhagens de *B. thuringiensis* que amplificaram o gene *bceT*.

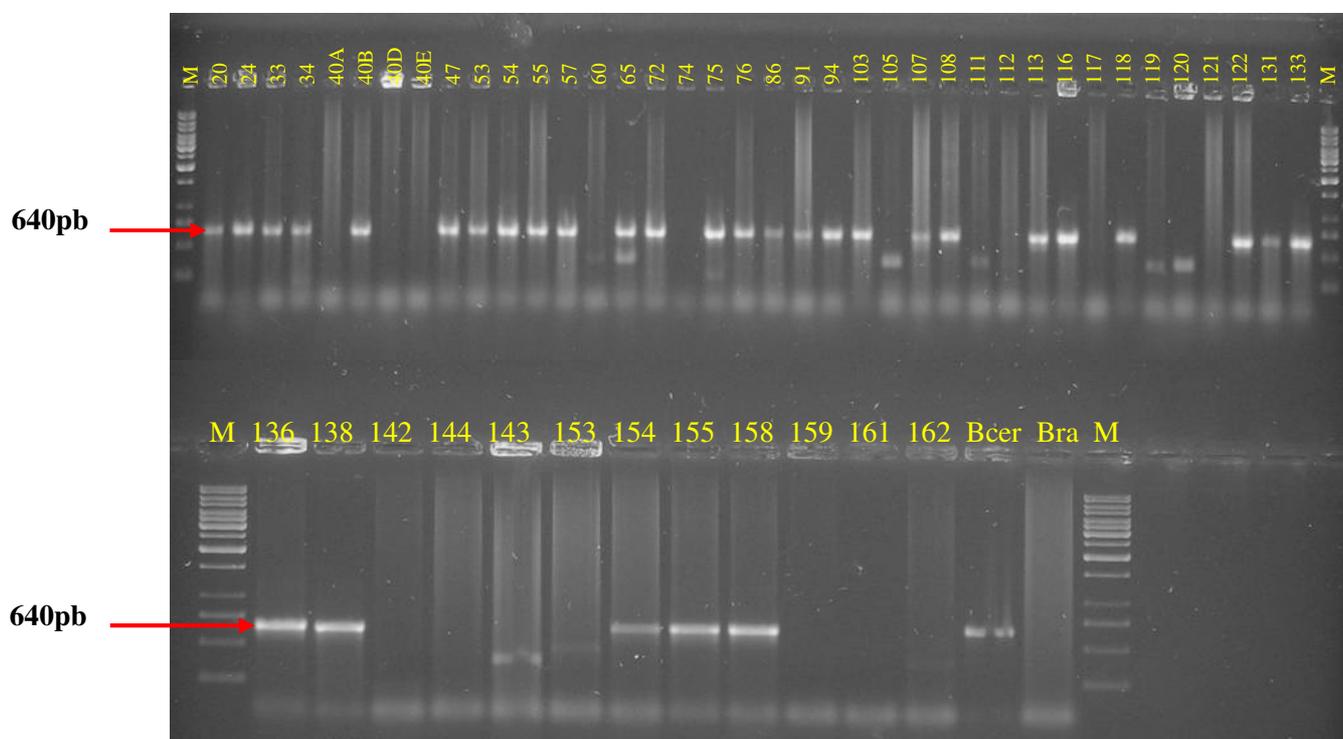


Figura 08: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 640pb resultante da amplificação do gene *bceT* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

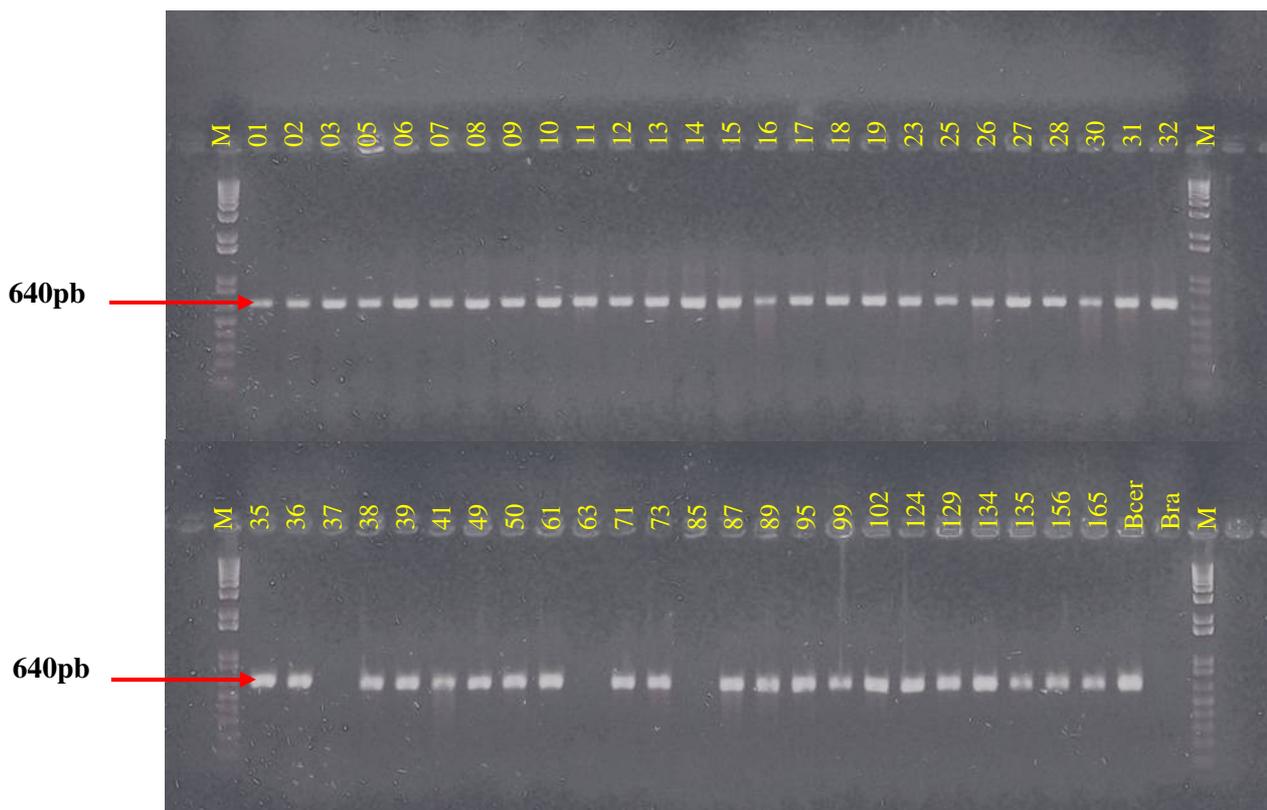


Figura 09: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 640pb resultante da amplificação do gene *bceT* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

A análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1% das 100 linhagens de *B. thuringiensis* evidenciou uma banda de 640 pb correspondente ao fragmento do gene *bceT*. Como mostram as figuras 08 e 09 o fragmento do gene que codifica a enterotoxina T (BceT) esteve presente em 78% das linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas.

5.2 ENTEROTOXINA HBL

5.2.1 Componente B (gene *hblA*)

A fim de verificar a presença do gene *hblA* nas linhagens de *B. thuringiensis* foi utilizado o par de iniciadores *hblAF* e *hblAR* que amplificaram um fragmento de 360 pb correspondente ao gene codificador do componente B da hemolisina BL (HBL). A análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1% revelou os resultados que são mostrados nas figuras a seguir (figuras 10 e 11).

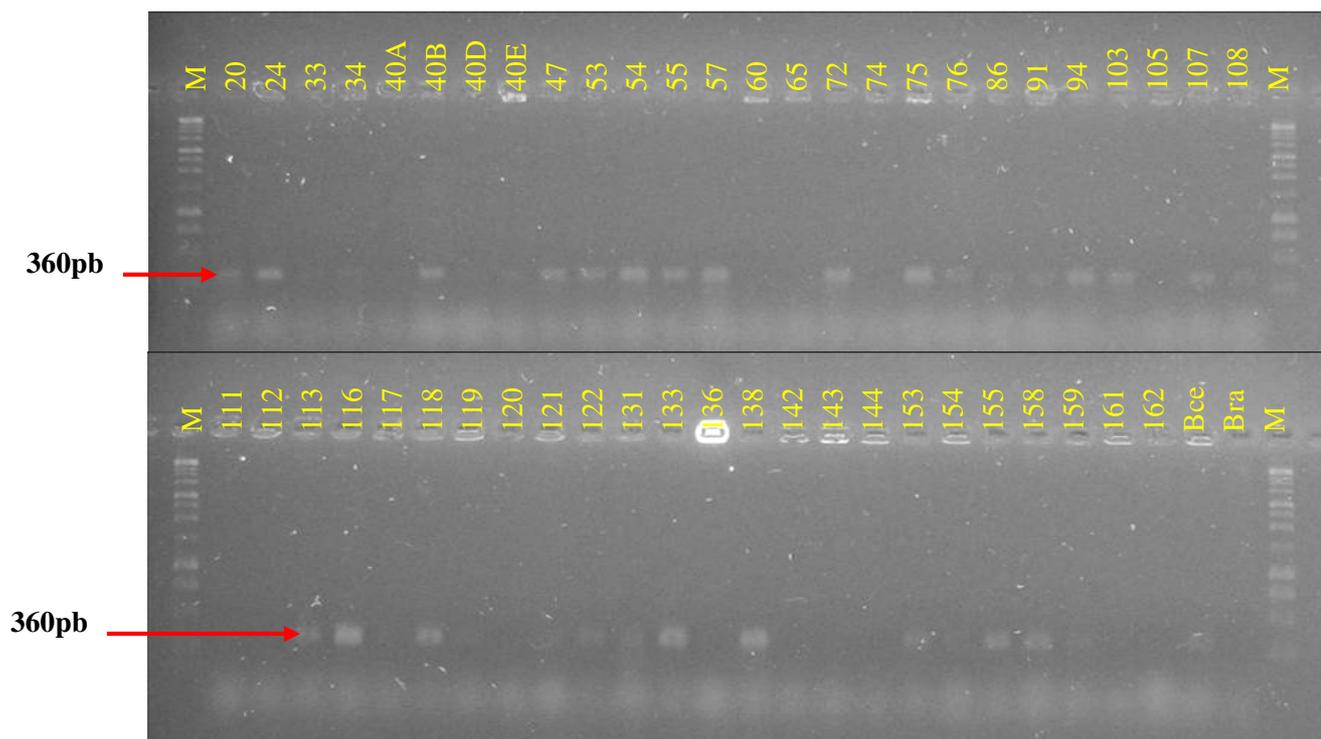


Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 360pb resultante da amplificação do gene *hblA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcc – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

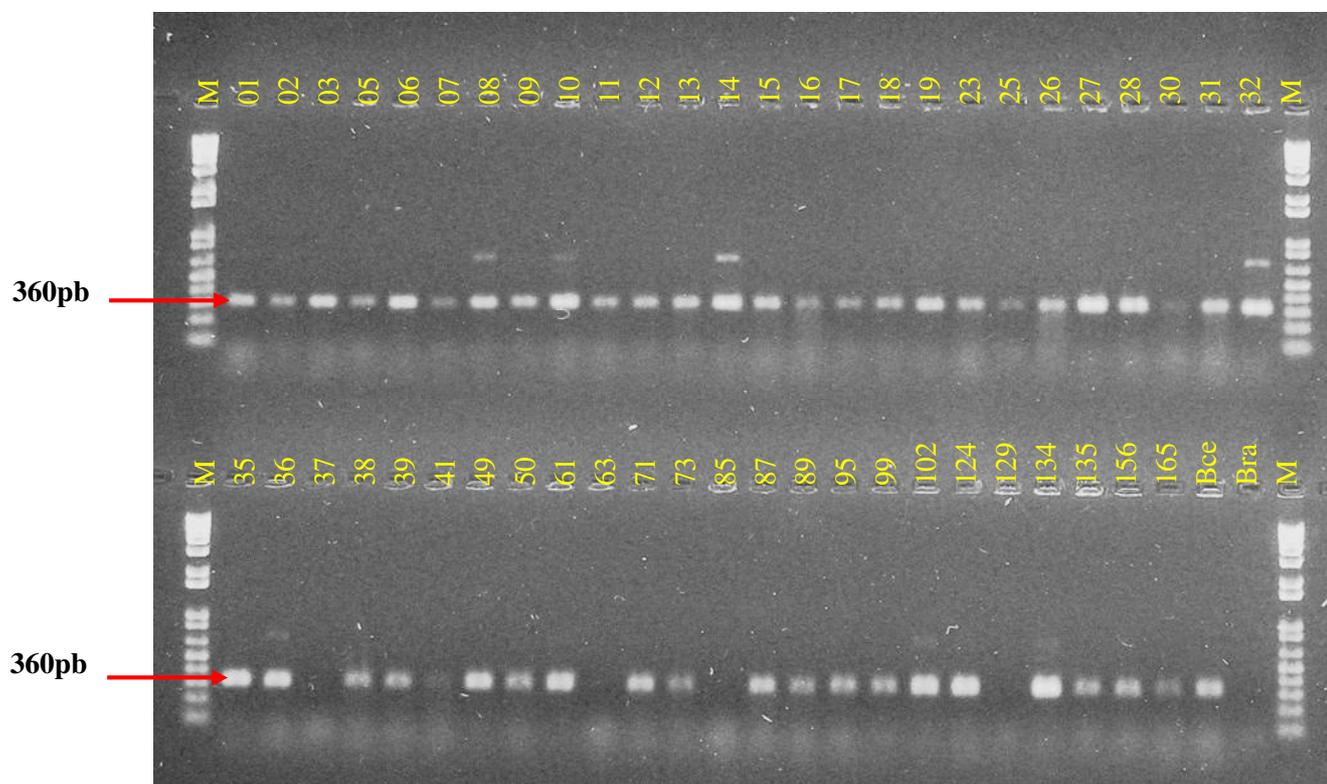


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 360pb resultante da amplificação do gene *hblA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcc – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

Conforme mostram as figuras 10 e 11 foi observado que das 100 linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no estado, um total de 77 linhagens (77%) demonstraram a presença do fragmento de 360 pb que corresponde ao gene *hblA*.

Surpreendentemente, o segundo grupo (figura 11) de linhagens testadas revelou um resultado muito superior em quantidade para este gene do que as linhagens testadas no primeiro grupo (figura 10), além das bandas apresentarem-se mais visíveis.

Contudo, algumas destas linhagens apresentaram bandas inespecíficas acima de 650 pb do marcador molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). Isto, porém, não invalida o resultado obtido nestas linhagens porque a banda de interesse foi revelada com maior destaque nas mesmas, e que corresponde ao tamanho do fragmento amplificado pelo par de iniciadores do gene *hblA*.

5.2.2 Componente L₁ (gene *hblD*)

Para o gene *hblD* que codifica o componente lítico L₁ da hemolisina BL foi utilizado o par de iniciadores L1F e L1R. O fragmento que amplifica o gene *hblD* possui um tamanho de 410 pb, conforme é evidenciado nas figuras 12 e 13.

Após as amostras terem sido submetidas à PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% cujos resultados são apresentados nas figuras que se seguem.

Os resultados obtidos pela técnica de PCR e analisados por eletroforese indicaram a presença do fragmento correspondente ao gene *hblD* em 65% das linhagens de *B. thuringiensis*, o que equivale a um número total de 65 linhagens.

Nota-se mais uma vez que o segundo grupo (figura 13) apresentou um melhor resultado de linhagens *hblD*-positivas do que o primeiro grupo (figura 12). Além disso, a banda do fragmento que indica a presença do gene *hblD* foi mais visível neste segundo grupo do que no primeiro.

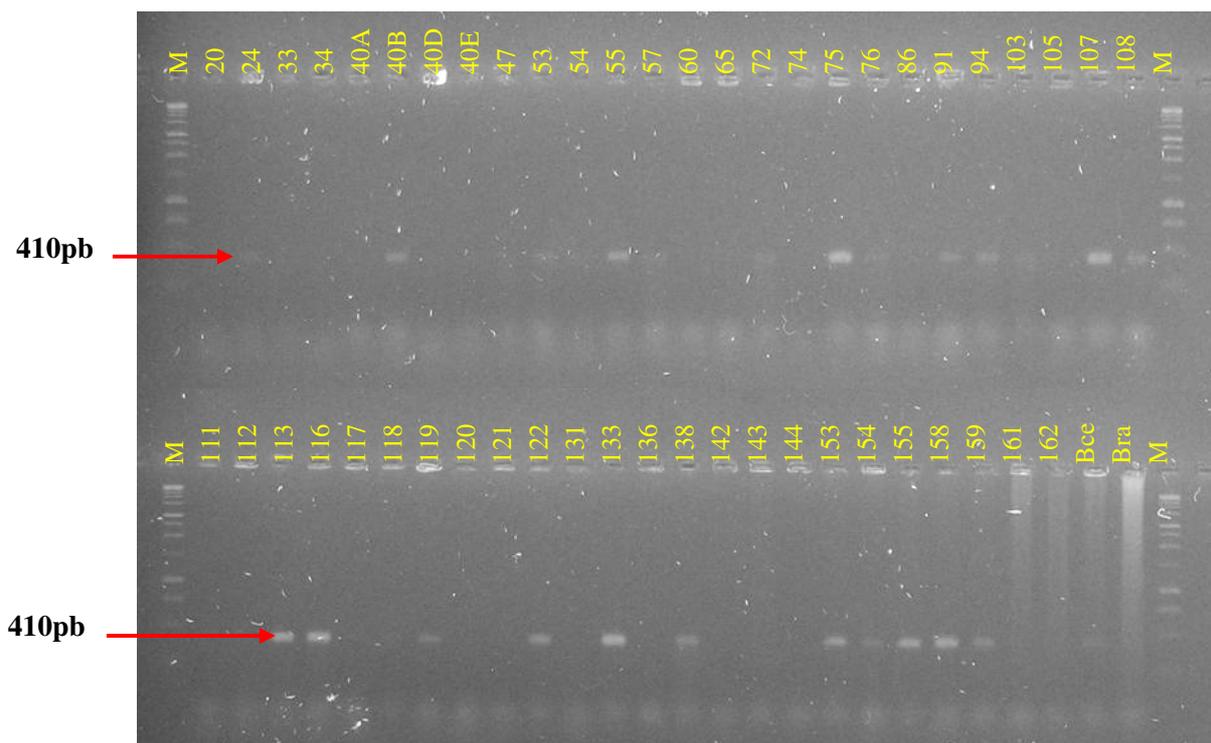


Figura 12: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 410pb resultante da amplificação do gene *hblD* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

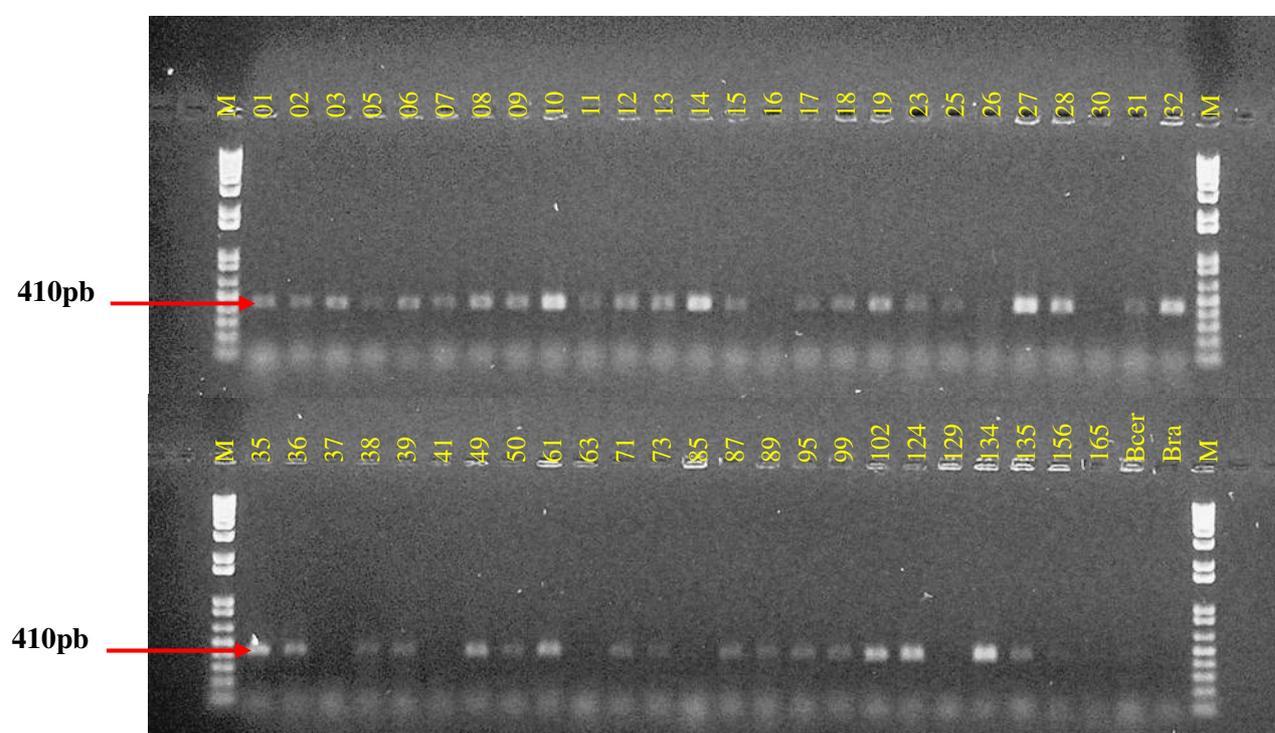


Figura 13: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 410pb resultante da amplificação do gene *hblD* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

5.2.3 Componente L₂ (gene *hblC*)

Com a finalidade de verificar a presença do gene *hblC* codificador do componente lítico L₂ da hemolisina BL (HBL) foi utilizado o par de iniciadores L2F e L2R que amplificam um fragmento de 730pb correspondente ao gene *hblC*.

Os dados obtidos pela técnica de PCR para as 100 linhagens de *B. thuringiensis* são demonstrados nas figuras 14 e 15.

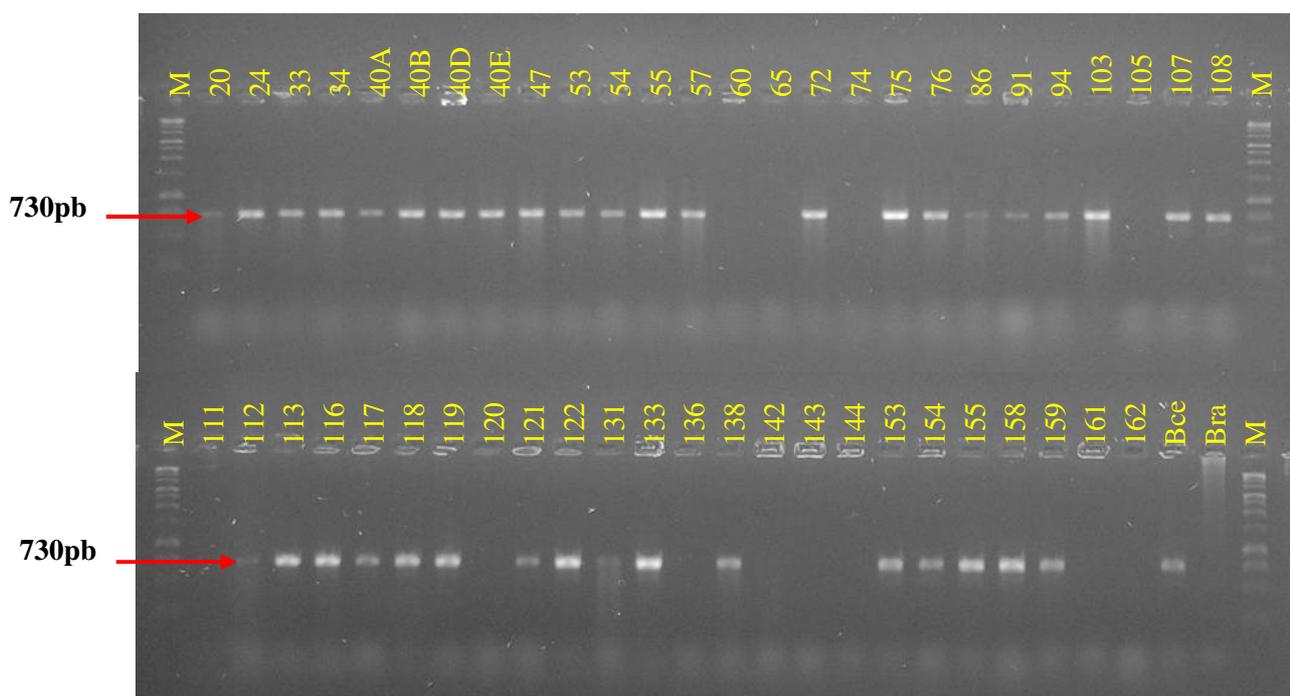


Figura 14: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 730pb resultante da amplificação do gene *hblC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

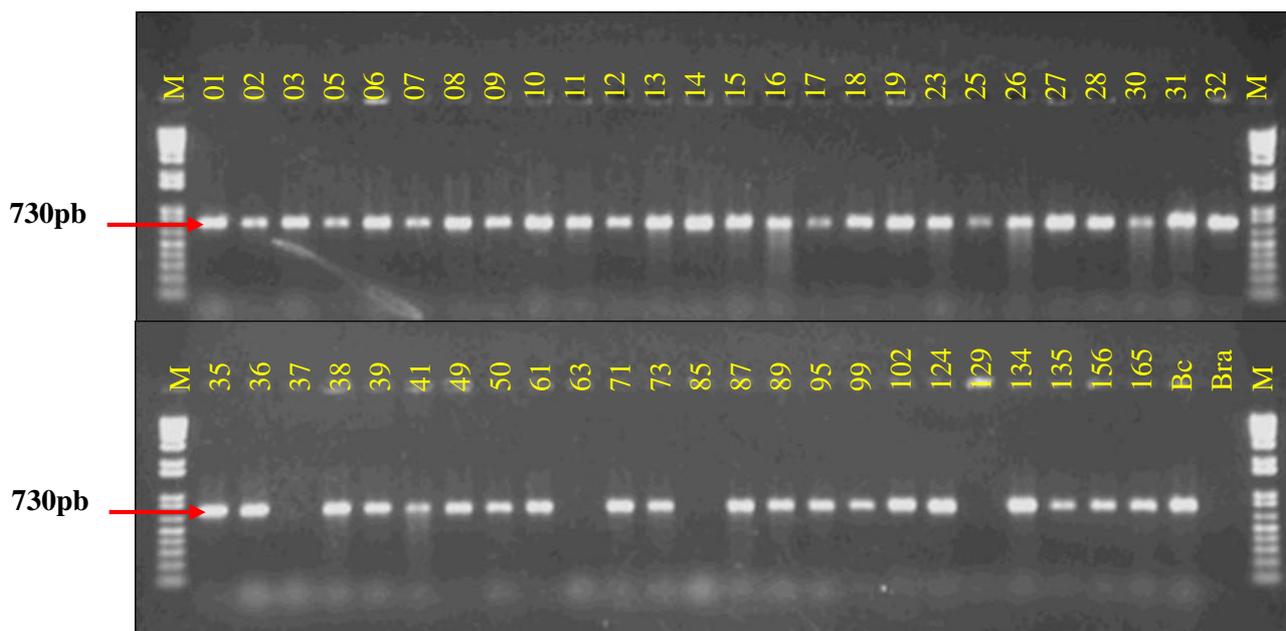


Figura 15: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 730pb resultante da amplificação do gene *hblC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bc – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

De acordo com os resultados mostrados nas figuras 14 e 15, um total de 84 linhagens (84%) de *B. thuringiensis* isoladas no estado foram positivas para o gene *hblC*. O tamanho do fragmento amplificado nestas linhagens corresponde a 730 pb, o que confirma a presença do gene *hblC* nestas linhagens.

Verifica-se que os dois grupos de linhagens de *B. thuringiensis* amplificaram bandas bem nítidas e um número de linhagens *hblC*-positivas muito parecido.

5.3 ENTEROTOXINA NHE

5.3.1 Componente A (gene *nheA*)

Para o gene *nheA* que codifica o componente A da enterotoxina não-hemolítica (NHE), foram utilizados os iniciadores *nheAF* e *nheAR*. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 479pb que corresponde ao gene *nheA*. A análise dos amplicons foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose e é mostrada nas figuras 16 e 17.

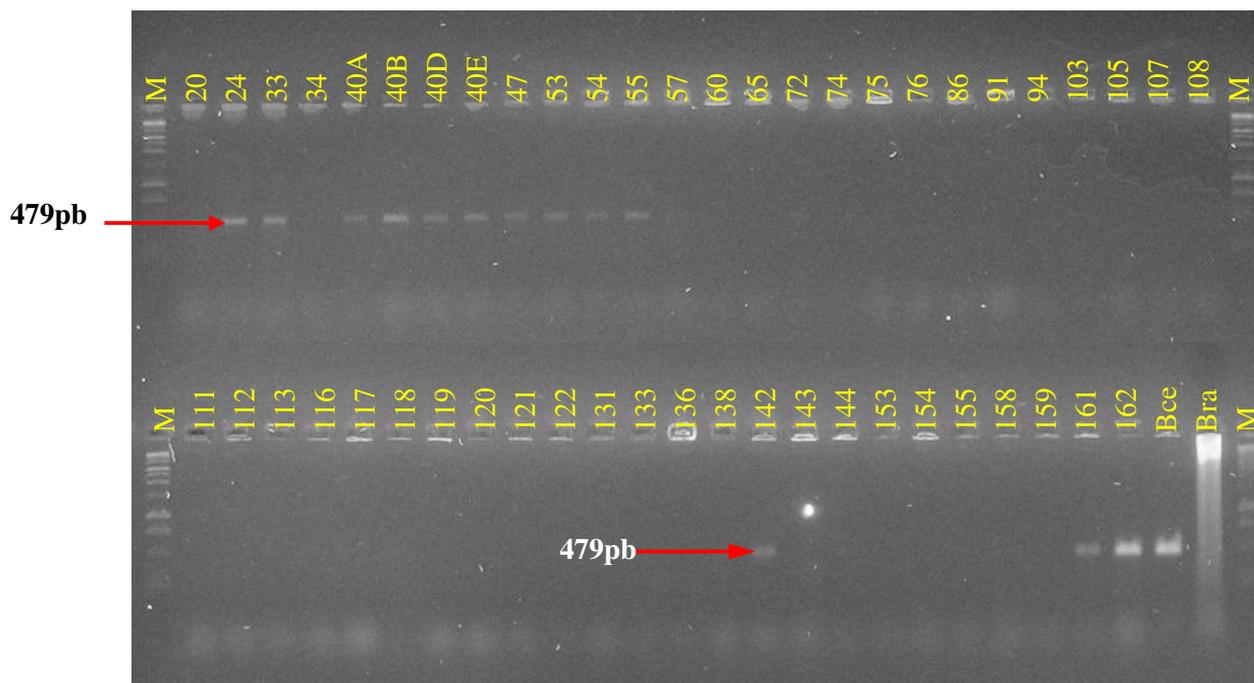


Figura 16: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 479pb resultante da amplificação do gene *nheA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

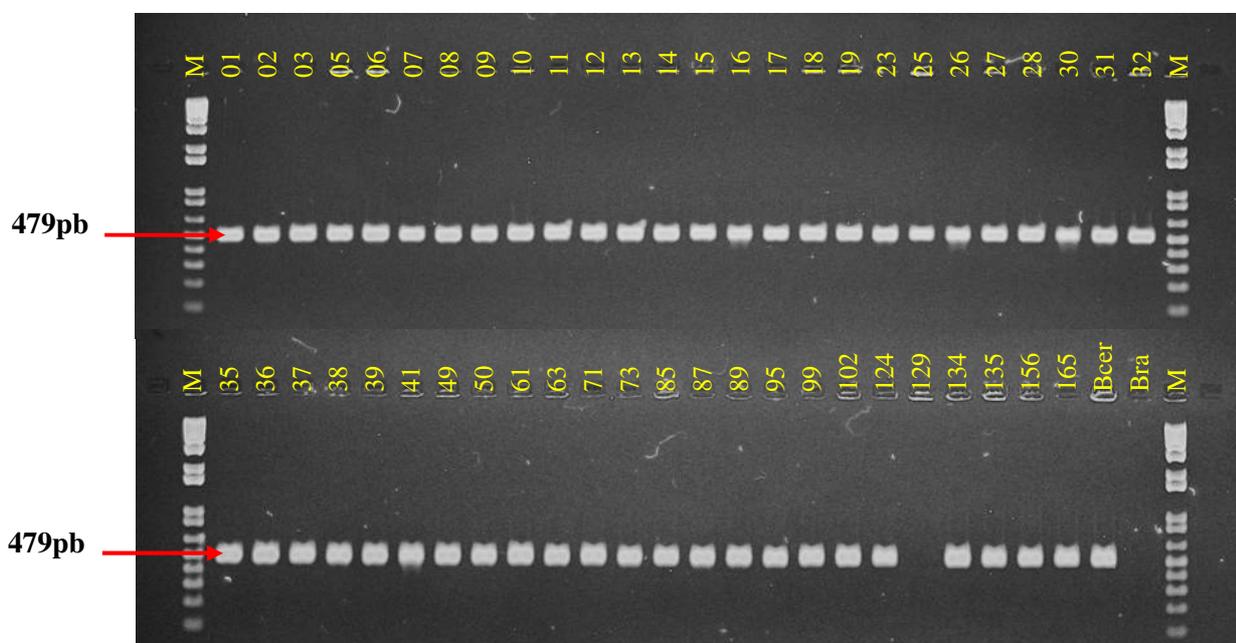


Figura 17: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 479pb resultante da amplificação do gene *nheA* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

A análise dos produtos da PCR por eletroforese mostrou que o fragmento de 479pb esteve presente em 63% das linhagens de *B. thuringiensis*, o que equivale a um número total

de 63 das 100 linhagens analisadas.

Notou-se que o segundo grupo (figura 17) de linhagens de *B. thuringiensis* apresentou um número maior de linhagens *nheA*-positivas do que o primeiro grupo (figura 16), além das bandas estarem mais nítidas. Mas, *a priori*, todas as linhagens amplificaram o fragmento que realmente corresponde ao gene *nheA* do componente A de NHE.

5.3.2 Componente B (gene *nheB*)

A fim de confirmar a presença do gene *nheB*, que codifica o componente B da enterotoxina NHE nas 100 linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas, foram utilizados na amplificação por PCR os iniciadores *nheBF* e *nheBR* que amplificam um fragmento com tamanho de 753pb correspondente ao gene em questão.

Os resultados da análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose 1% são observados nas figuras 18 e 19.

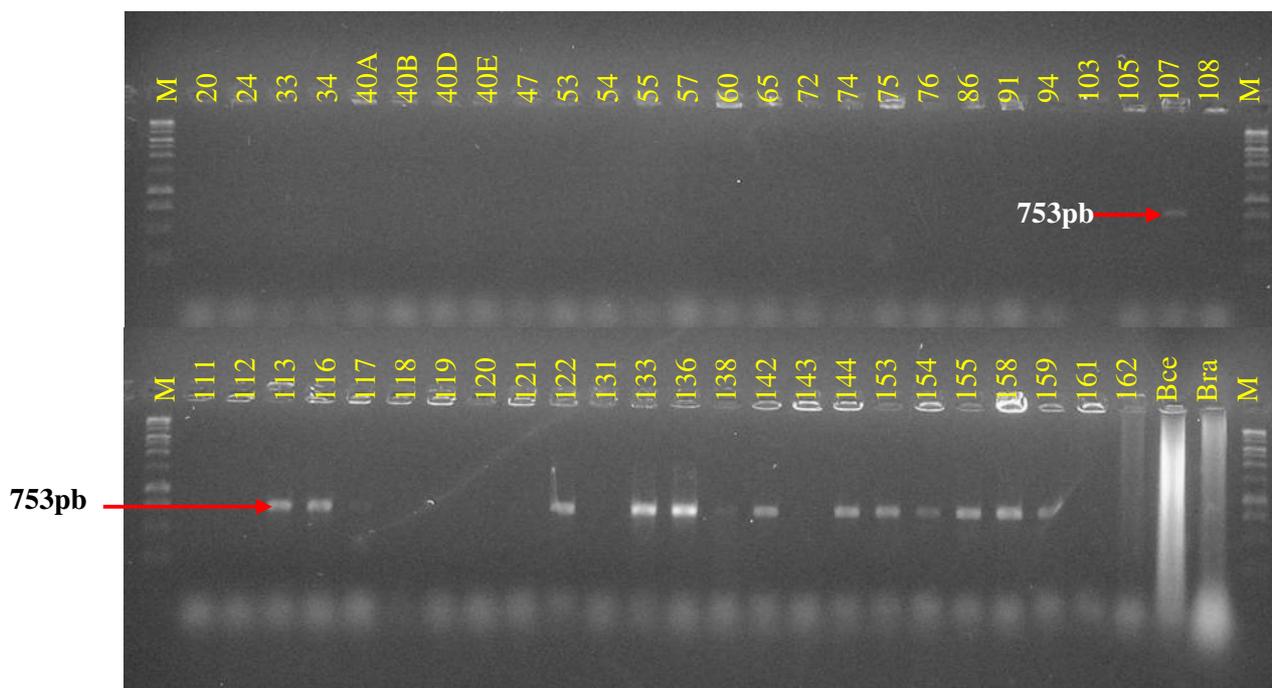


Figura 18: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 753pb resultante da amplificação do gene *nheB* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bce – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

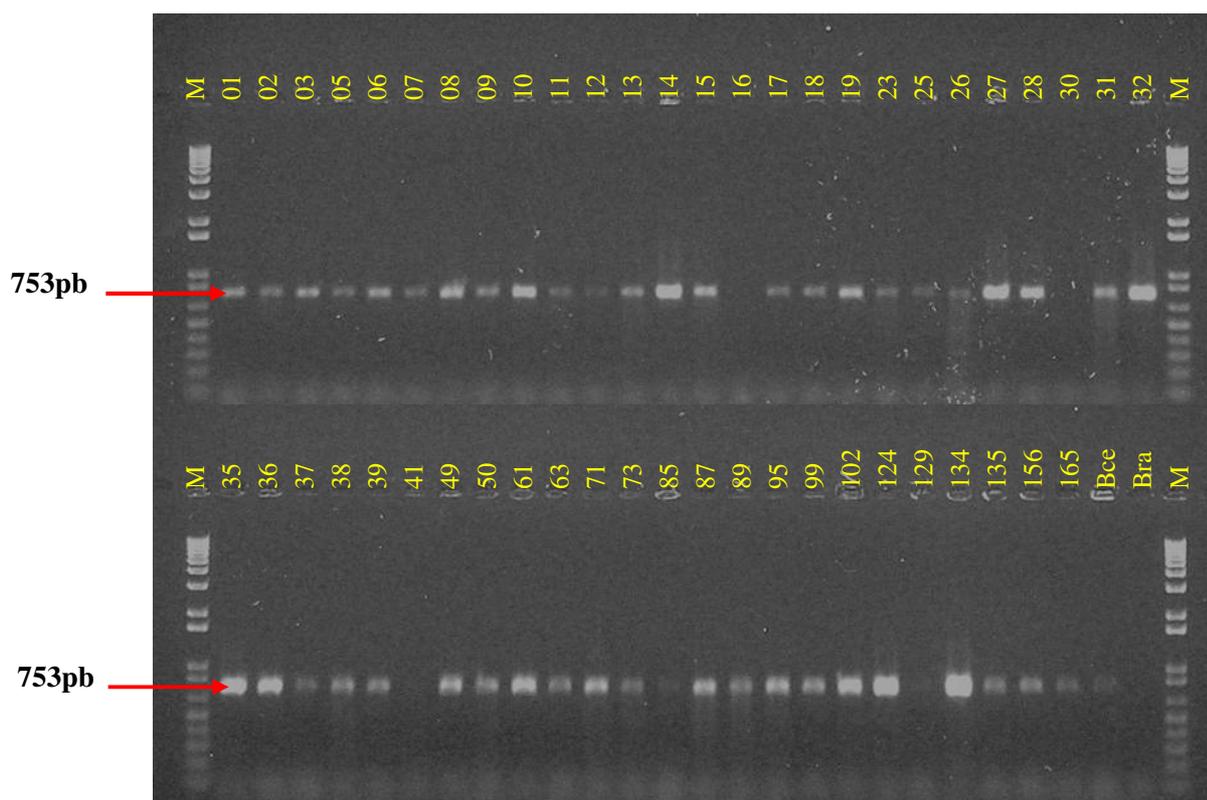


Figura 19: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 753pb resultante da amplificação do gene *nheB* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

Conforme mostram as figuras 18 e 19 foi evidenciado que das 100 linhagens de *B. thuringiensis*, um total de 59 linhagens (59%) demonstraram a presença do fragmento de 753 pb que corresponde ao gene *nheB*.

Os resultados mostrados nas figuras 18 e 19 confirmam, através da presença do fragmento, que estas linhagens isoladas no Amazonas são portadoras do gene *nheB*.

5.3.3 Componente C (gene *nheC*)

Com a finalidade de verificar a presença do gene *nheC*, foi preparada uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores *nheCF* e *nheCR* que amplificam um fragmento de 563pb que indica a presença do gene *nheC* codificador do componente C da enterotoxina não-hemolítica (NHE).

Os dados obtidos na técnica de PCR com este gene para as 100 linhagens de *B. thuringiensis* são apresentados nas figuras 20 e 21.

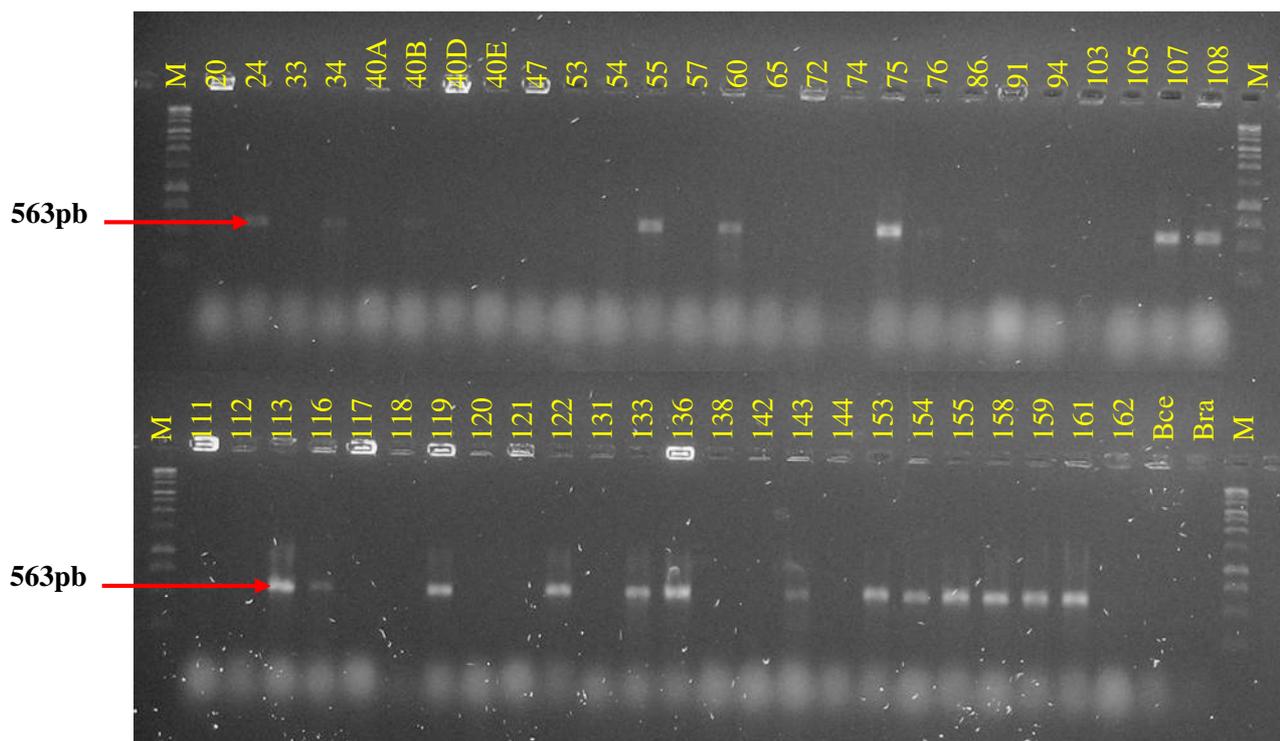


Figura 20: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 563pb resultante da amplificação do gene *nheC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 20 a 162 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

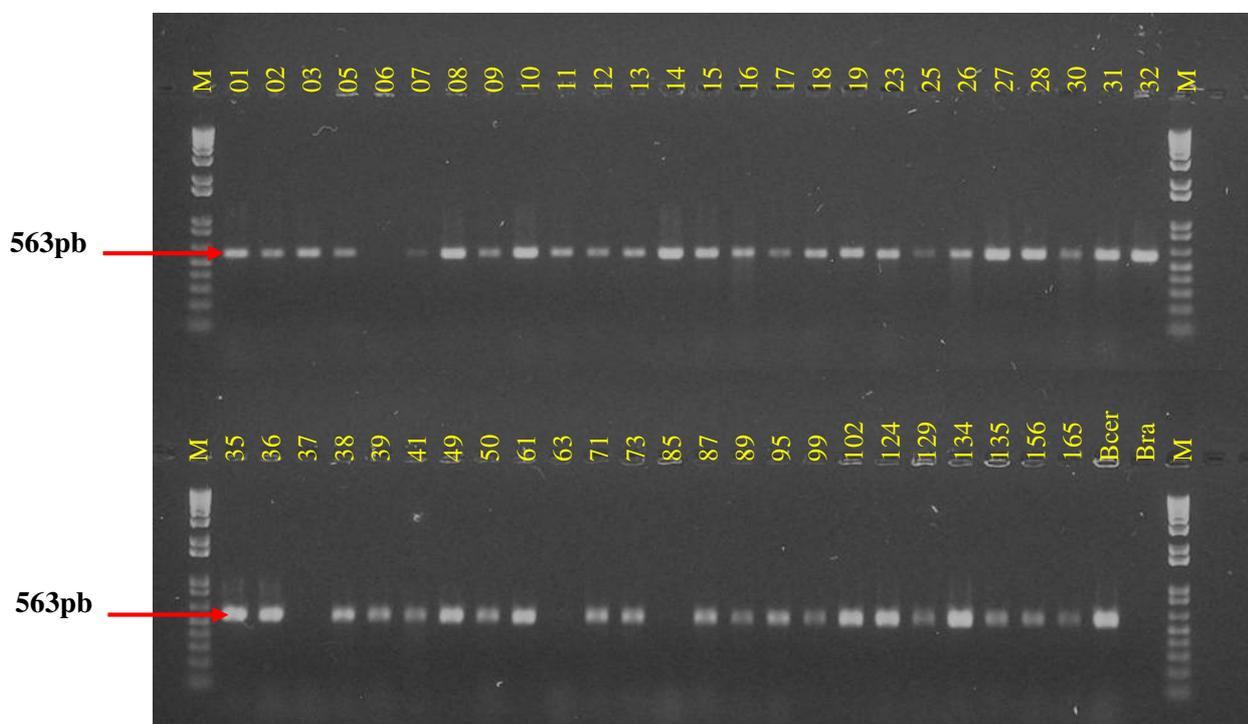


Figura 21: Perfil eletroforético em gel de agarose 1%, evidenciando um fragmento de 563pb resultante da amplificação do gene *nheC* nas linhagens de *B. thuringiensis*. M- marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 01 a 165 – linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas. Bcer – cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579. Bra – controle negativo.

Conforme mostram as figuras 20 e 21, a análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1% das 100 linhagens de *B. thuringiensis* amazônicas evidenciou uma banda de 563pb correspondente ao tamanho do fragmento que amplifica especificamente para o gene *nheC*. Os resultados indicam que um total de 67 linhagens foi positivo para este gene, o que equivale a 67% de todas as linhagens de *B. thuringiensis* analisadas.

Os resultados obtidos por PCR em cada gene de enterotoxina estudado revelaram que as linhagens de *B. thuringiensis* foram, em média, 70,43% positivas para todos os genes de enterotoxinas analisados.

5.4 PERFIS GENOTÍPICOS DAS LINHAGENS DE *B. thuringiensis* AMPLIFICADAS PARA OS GENES DE ENTEROTOXINAS

Os resultados obtidos pela reação de PCR, de cada linhagem de *B. thuringiensis* amplificada ou não, com cada iniciador específico para os genes codificadores das enterotoxinas estão organizados na Tabela 06. Esta etapa teve como finalidade identificar quais genes poderiam estar presentes nos isolados de *B. thuringiensis*, bem como determinar o perfil genotípico das 100 linhagens de *B. thuringiensis* (vide tabela 06).

Tabela 06: Identificação e caracterização genotípica de enterotoxinas apresentada pelas 100 linhagens de *B. thuringiensis*.

<i>Linhagens</i>	<i>bceT</i>	<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>
<i>B. cereus</i>							
ATCC 14579	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 01	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 02	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 03	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 05	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 06	+	+	+	+	+	+	-
BtAM 07	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 08	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 09	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 10	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 11	+	+	+	+	+	+	+

BtAM 53	+	+	+	+	+	-	-
BtAM 54	+	+	-	+	+	-	-
BtAM 55	+	+	+	+	+	-	+
BtAM 57	+	+	-	+	-	-	-
BtAM 60	-	-	-	-	-	-	+
BtAM 61	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 63	-	-	-	-	+	+	-
BtAM 65	+	-	-	-	-	-	-
BtAM 71	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 72	+	+	+	+	-	-	-
BtAM 73	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 74	-	-	-	-	-	-	-
BtAM 75	+	+	+	+	-	-	+
BtAM 76	+	+	+	+	-	-	-
BtAM 85	-	-	-	-	+	+	-
BtAM 86	+	+	-	+	-	-	-
BtAM 87	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 89	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 91	+	+	+	+	-	-	-
BtAM 94	+	+	+	+	-	-	-
BtAM 95	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 99	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 102	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 103	+	+	+	+	-	-	-
BtAM 105	-	-	-	-	-	-	-
BtAM 107	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 108	+	+	+	+	-	-	+
BtAM 111	-	-	-	-	-	-	+
BtAM 112	-	-	-	+	-	-	-
BtAM 113	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 116	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 117	-	-	-	+	-	-	-
BtAM 118	+	+	-	+	-	-	-

BtAM 119	-	-	+	+	-	-	+
BtAM 120	-	-	-	-	-	-	-
BtAM 121	-	-	-	+	-	-	-
BtAM 122	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 124	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 129	+	-	-	-	-	-	+
BtAM 131	+	+	-	+	-	-	-
BtAM 133	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 134	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 135	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 136	+	-	-	-	-	+	+
BtAM 138	+	+	+	+	-	-	-
BtAM 142	-	-	-	-	+	+	-
BtAM 143	-	-	-	-	-	-	+
BtAM 144	-	-	-	-	-	+	-
BtAM 153	-	+	+	+	-	+	+
BtAM 154	+	-	+	+	-	+	+
BtAM 155	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 156	+	+	+	+	+	+	+
BtAM 158	+	+	+	+	-	+	+
BtAM 159	-	+	+	+	-	+	+
BtAM 161	-	-	-	-	+	-	+
BtAM 162	-	-	-	-	+	-	-
BtAM 165	+	+	-	+	+	+	+

De posse desses perfis genotípicos foram montados grupos e a classificação genotípica foi realizada de acordo com a amplificação por PCR de cada linhagem. Esses grupos foram enumerados de G01 a G27, conforme a ordem de entrada na tabela. Contudo, as linhagens que se enquadraram no G27 foram as últimas a ser consideradas, pois como foram negativas para todos os genes considerou-se melhor enumerá-las por último, em contraste com G01 que amplificou todos os genes. A cepa *B. cereus* ATCC 14579 não foi inclusa.

De acordo com os dados referenciados na tabela de caracterização genotípica, foi evidenciado que 41% das linhagens de *B. thuringiensis* foram positivas para todos os genes de enterotoxinas (*bceT*, *hblA*, *hblD*, *hblC*, *nheA*, *nheB* e *nheC*) investigados. Em contrapartida,

apenas 3% das linhagens de *B. thuringiensis* foram negativas para todos os genes investigados.

O restante das linhagens apresentou perfis genotípicos distintos, sendo que alguns deles se repetiram em outras linhagens. Outros, porém, foram restritos a somente uma linhagem. O perfil genotípico e a classificação genotípica dos grupos referentes às 100 linhagens de *B. thuringiensis* é mostrado na tabela que se segue.

Tabela 07: Perfis genotípicos e classificação genotípica das linhagens de *B. thuringiensis*, conforme a amplificação por PCR.

Grupos genotípicos	Perfis de amplificação dos genes							Nº de linhagens
	<i>bceT</i>	<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
G01	+	+	+	+	+	+	+	41
G02	+	+	+	+	+	+	-	1
G03	+	+	-	+	+	-	+	3
G04	+	+	-	+	+	-	-	4
G05	+	+	+	+	+	-	+	2
G06	+	+	-	+	-	-	+	1
G07	-	-	-	-	+	+	-	4
G08	-	-	-	+	+	-	-	2
G09	+	+	+	+	+	-	-	2
G10	-	+	-	+	+	-	-	1
G11	+	+	-	+	-	-	-	4
G12	-	-	-	-	-	-	+	3
G13	+	-	-	-	-	-	-	1
G14	+	+	+	+	-	-	-	6
G15	+	+	+	+	-	-	+	2
G16	+	+	+	+	-	+	+	7
G17	-	-	-	+	-	-	-	3
G18	-	-	+	+	-	-	+	1
G19	+	-	-	-	-	-	+	1
G20	+	-	-	-	-	+	+	1
G21	-	-	-	-	-	+	-	1
G22	-	+	+	+	-	+	+	2
G23	+	-	+	+	-	+	+	1

G24	-	-	-	-	+	-	+	1
G25	-	-	-	-	+	-	-	1
G26	+	+	-	+	+	+	+	1
G27	-	-	-	-	-	-	-	3
Total de linhagens								100

5.5 SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS DOS GENES DE ENTEROTOXINAS

As 169 sequências de DNA em boas condições de análise foram submetidas ao sítio do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e analisados por meio do programa BLAST 2 Sequence (ZHANG *et al.*, 2000), o qual analisa e compara a sequência de nucleotídeos da amostra padrão depositada no GenBank com as amostras submetidas ao BLASTN.

Foi feita também a análise das sequências de aminoácidos referentes a estas 169 amostras. A ferramenta utilizada para a análise de aminoácidos foi o BLASTX 2 Sequence (ALTSCHUL *et al.*, 1997), o qual tem a mesma finalidade conferida ao BLASTN.

Após os resultados obtidos através do BLASTN e BLASTX, foi feita a análise molecular no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007) e também no programa *CLC Sequence Viewer 6.0 version* (obtido no sítio www.clcbio.com).

O alinhamento global foi feito na ferramenta CLUSTALW por meio do programa *CLC Sequence Viewer*, por se achar que este obtinha um resultado mais rápido e detalhado comparado com o MEGA.

Para as sequências de DNA (anexos 01-07) conseguiu-se obter um alinhamento para todos os genes de enterotoxinas em estudo [*bceT* (anexo 01); *hblA* (anexo 02); *hblD* (anexo 03); *hblC* (anexo 04); *nheA* (anexo 05); *nheB* (anexo 06); e *nheC* (anexo 07)]. O alinhamento mostrado nos anexos para as sequências de DNA são mostrados no modo identidade, o qual analisa o grau de identidade que elas possuem com a sequência padrão.

Para as sequências de aminoácidos só foi possível obter resultado para três proteínas referentes a L1 (anexo 08), L2 (anexo 09) e o componente A de NHE (NheA) (anexo 10). Tal fato se deve em virtude destas sequências não apresentarem stop codons. As outras sequências de aminoácidos referentes a BceT, Hbl B (componente B de HBL), NheB e NheC apresentaram stop codons e, portanto, não foram consideradas. O alinhamento para as sequências de aminoácidos foi baseado no modo similaridade de proteína.

6 DISCUSSÃO

Dada a importância que *B. thuringiensis* oferece para o controle de pragas e vetores de doenças tropicais, o que é facilmente observado na vastidão de referências bibliográficas específicas, abrangendo campos que medeiam desde a taxonomia até a biologia molecular, é que direcionamos nossas pesquisas para esta espécie.

Este trabalho envolveu a identificação nos isolados amazônicos de *B. thuringiensis* dos genes *bceT*, *hblA*, *hblD*, *hblC*, *nheA*, *nheB* e *nheC*, codificadores das enterotoxinas BceT, HBL e NHE, respectivamente.

Também foi efetuada a caracterização genotípica, seguida da classificação em grupos, demonstrada pela amplificação por PCR de cada linhagem de *B. thuringiensis* a um determinado tipo de iniciador. Para algumas linhagens de *B. thuringiensis* foi realizado o procedimento de sequenciamento de nucleotídeos e de aminoácidos dos genes enterotóxicos.

No Brasil, o levantamento de novos isolados de *B. thuringiensis* entomopatogênicos de solo não tratado com inseticidas biológicos foi relatado por Guaycurus *et al.* (1988). Neste trabalho, as amostras de *B. thuringiensis* utilizadas foram isoladas de diversas fontes naturais (solos, insetos, plantas, água) e oriundas de distintas localidades do Estado do Amazonas (vide figura 07), tendo como metodologia de isolamento a descrita por Guaycurus *et al.* (1999).

Através das características morfotintoriais e morfomoleculares, obtidas pela coloração de Gram e pela microscopia sob contraste de fase, todas as linhagens de *B. thuringiensis* foram Gram-positivas, apresentaram células móveis, isoladas, aos pares e algumas vezes formando pequenas cadeias. Os esporos livres eram elípticos a cilíndricos, sendo que no esporângio localizavam-se na posição central a subterminal, não deformante ao restante da célula. A presença de cristais pode ser visualizada no citoplasma de todas as células bacilares.

Os resultados detectados pela técnica de PCR, neste estudo, corroboram com os trabalhos de diferentes autores que analisaram a presença destes genes de enterotoxinas em linhagens de *Bacillus*. Como está descrito em várias referências, estes genes codificadores das enterotoxinas (BceT, HBL e NHE) estão envolvidos com surtos de intoxicação alimentar por *B. cereus* (OMBUI *et al.*, 1997; MÄNTYNEN e LINDSTRÖM, 1998; HENDRIKSEN *et al.*, 2006; MORAVEK *et al.*, 2006; SWIECICKA *et al.*, 2006; AL-KHATIB *et al.*, 2007; SVENSSON *et al.*, 2007; OUOBA *et al.*, 2008).

Diversas pesquisas relacionam a semelhança de *B. cereus* com *B. thuringiensis* e a

produção e ocorrência destas enterotoxinas em *B. thuringiensis* pelo fato desta bactéria pertencer ao mesmo grupo de *Bacillus*, conhecido como grupo *Bacillus cereus*. Este grupo também inclui as espécies *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides* (BOURQUE *et al.*, 1995; CARLSON *et al.*, 1996; HSIEH *et al.*, 1999; PRÜB *et al.*, 1999; HELGASON *et al.*, 2000; STENFORS e GRANUM, 2001; INT'VELD *et al.*, 2001; HANSEN e HENDRIKSEN, 2001; GUINEBRETIERE *et al.*, 2002; STENFORS *et al.*, 2002; GRAY *et al.*, 2005; MORAVEK *et al.*, 2006; MINAARD *et al.*, 2007).

No trabalho de Minaard *et al.* (2007) foram feitas múltiplas análises em linhagens de *B. cereus* para comprovar a presença de genes responsáveis pela virulência desta bactéria. Pela técnica de PCR e de ribotipagem, constataram que 10 linhagens apresentaram ao menos uma das seqüências de hemolisina BL e 20 estirpes demonstraram, ao menos, uma das seqüências da enterotoxina não-hemolítica (NHE). Como relatado por Lindbäck *et al.* (2004) e Guinebrière *et al.* (2002), o operon *nhe* está presente em quase todas as linhagens de *B. cereus*. Minaard *et al.* (2007) encontraram amplicons com ao menos uma seqüência de *nhe(ABC)* em 20 (95%) das 21 linhagens estudadas. O gene *bceT* foi detectado em nove linhagens de *B. cereus*.

Gray *et al.* (2005) através da análise de PCR detectaram a presença do gene *hblA* em duas linhagens de *B. thuringiensis* e na maioria das linhagens de *B. cereus* utilizadas em seu trabalho. Ankolekar *et al.* (2008) estudaram 11 isolados de *B. thuringiensis* e determinaram a presença do gene *nheA* em todos os isolados, utilizando um par de iniciador específico. Ainda, nove dos onze isolados de *B. thuringiensis* foram positivos para os genes *hblA* e *hblD*. Através do kit RPLA (Oxoid), que determina a presença do componente L₂ de HBL, foi detectado também a presença deste componente em todos os isolados de *B. thuringiensis*.

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente relatados por distintos autores por apresentarem os genes *nhe* e *hbl* e suas toxinas associadas, NHE e hemolisina BL (ABDELHAMEED e LANDEN, 1994; PRUß *et al.*, 1999; GAVIRIA RIVERA *et al.*, 2000; HANSEN e HENDRIKSEN, 2001; KYEI-POKU *et al.*, 2007; NGAMWONGSATIT *et al.*, 2008; PHELPS e MCKILLIP, 2002).

Bartoszewicz *et al.* (2008) detectaram a presença do gene *nheA* em 17 de 20 isolados de *B. thuringiensis*. Para o gene *hblA*, 11 das 20 linhagens foram positivas para este gene. Similarmente, 178 isolados de *B. cereus* foram positivas para *nheA* e 123 foram positivas para *hblA*, de um total de 227 isolados do leite. Os isolados de *B. thuringiensis* foram coletados de amostras de leite fresco em diferentes estações do ano.

No estudo de Kalyan Kumar *et al.* (2008) foi investigada a presença dos genes de

HBL em cepas de diferentes espécies de *Bacillus*. Dentre estas espécies de *Bacillus* as que apresentaram resultado positivo em testes de atividade hemolítica foram as cepas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*. O mesmo trabalho apontou, por meio da análise de Western Blot, a presença dos componentes da enterotoxina HBL (B, L₁ e L₂). Notadamente, três das quatro cepas de *B. thuringiensis* utilizadas no estudo foram positivas para HBL por Western Blot.

Kim e Batt (2008) analisaram por PCR 72 linhagens de *B. cereus* e cinco de *B. thuringiensis* para os genes do complexo HBL e da enterotoxina BceT. Um total de 46 (64%) de linhagens de *B. cereus* foram positivas por PCR para os genes *hblA*, *hblC* e *hblD* da hemolisina BL. As cinco linhagens de *B. thuringiensis* foram positivas para os três componentes da hemolisina BL. Por outro lado, um total de 41 (57%) das linhagens de *B. cereus* testadas foram positivas por PCR para o gene *bceT*, enquanto que todas as cinco linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram este gene.

Ngamwongsatit *et al.* (2008) estudaram a presença dos genes *hbl(ACD)* e *nhe(ABC)* em 616 linhagens de *Bacillus*, sendo 411 de *B. cereus* e 205 de *B. thuringiensis*. Os resultados deste estudo indicaram por PCR multiplex, a presença de todos os genes *hbl(ACD)* em 86,80% das linhagens de *B. thuringiensis*, mas somente em 65,94% das linhagens de *B. cereus*. A alta ocorrência dos genes *hbl* em *B. thuringiensis* revelou que este operon é mais comum em *B. thuringiensis* do que em *B. cereus*, como previamente sugerido por Gaviria Rivera *et al.* (2000). Em contrapartida, todas as linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* apresentaram os genes do complexo NHE (genes *nheABC*).

De acordo com Swiecicka *et al.* (2006) linhagens de *B. thuringiensis* portando os genes da enterotoxina NHE foram encontrados mais frequentemente (*nheA*, 100%; *nheB*, 77%; *nheC*, 96%) do que aquelas com os genes da hemolisina BL (*hblACD*, 74%).

Yuan *et al.* (2002) determinaram a presença do gene *bceT* e de *hblA* em quatro linhagens de *B. thuringiensis* sub. *israelensis* tanto pelo método de PCR quanto por imunoensaio (TECRA VIA e BCET-RPLA) quando comparadas com a linhagem *B. cereus* F4433/73 (linhagem de isolado clínico).

Zhou *et al.* (2008) investigaram a ocorrência de nove isolados de *B. thuringiensis* em leite pasteurizado e detectaram a presença de todos os genes da enterotoxina NHE (*nheA* 100%, *nheB* 100% e *nheC* 100%) nestes isolados. Os resultados de PCR também mostraram os genes da hemolisina BL (*hblA*, *hblD* e *hblC*) em sete dos nove (cerca de 77,8% do total) isolados de *B. thuringiensis*.

A existência de genes de enterotoxinas relacionados a *B. cereus* e sua expressão em *B. thuringiensis* foram relatados por outros estudos (DAMGAARD *et al.*, 1996; GAVIRIA

RIVERA *et al.*, 2000; HANSEN e HENDRIKSEN, 2001).

Conforme relatos de Drobniowski (1994), *B. thuringiensis* não constitui em ameaça alguma à saúde humana quando usado como um pesticida microbiano.

Nesta pesquisa, as melhores condições para a amplificação, via PCR, tais como concentração dos iniciadores, dos dNTPs, do MgCl₂, da Taq DNA polimerase, assim como o grid de anelamento dos iniciadores (item 4.8.2), foram cuidadosamente analisadas e estabelecidas.

Com base nos resultados fornecidos pela técnica de PCR, ficou evidenciado que não foi necessário a extração e purificação do DNA, pois as células bacterianas foram lisadas através de um protocolo simples e rápido de fervura e congelamento (item 4.6.1), o que está em conformidade com os dados obtidos por Guaycurus (1999).

A aplicação da técnica de PCR com iniciadores específicos e diferenciais (tabela 03), para as enterotoxinas NHE, HBL e BceT mostrou-se amplamente útil na identificação e na determinação de quais dos genes de enterotoxinas, relacionados com os fatores de virulência, estariam presentes nas estirpes de *B. thuringiensis* (tabela 06) e, também, na caracterização do perfil genotípico (tabela 07).

Conforme o perfil genotípico, vinte e sete grupos puderam ser caracterizados (vide Tabela 07). Pelos resultados o grupo 01 reuniu 41% dos isolados de *B. thuringiensis* que amplificaram os genes codificadores das enterotoxinas.

Chama atenção que somente 3% das estirpes de *B. thuringiensis* não apresentaram perfil de amplificação para nenhum dos sete genes codificadores das enterotoxinas estudadas (Tabela 07).

De acordo com a identificação molecular fornecida pela reação de PCR, foi possível determinar quais dos genes que codificam as enterotoxinas (BceT, HBL e NHE) estariam presentes nos isolados de *B. thuringiensis*. E, pelos resultados obtidos, 84% das cepas de *B. thuringiensis* foram positivas para o gene *hblC*; 78% para o gene *bceT*; 77% para o gene *hblA*; 67% para o gene *nheC*; 65% para o gene *hblD*; 63% para o gene *nheA*; e 59% para o gene *nheB*.

Dos resultados analisados, pode-se destacar que 70,43% dos isolados de *B. thuringiensis* foram positivos, pelo menos, para um dos sete genes enterotóxicos avaliados (tabela 06).

A última etapa do trabalho baseou-se no sequenciamento do amplicon de algumas amostras de *B. thuringiensis*, cuja finalidade foi analisar e comparar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas com as sequências depositadas no *GenBank*.

Os resultados obtidos no sequenciamento estão disponíveis nos Anexos de 01 a 10 e são descritos a seguir.

As linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram regiões conservadas que estão localizadas no meio das seqüências correspondentes aos fragmentos amplificados dos genes de enterotoxinas pesquisados tanto na análise por BLASTN quanto por BLASTX. A análise pelas duas plataformas indicou que estas regiões conservadas estão presentes em todas as linhagens de *B. thuringiensis* estudadas.

Ademais, estas regiões constantes ou conservadas, provavelmente, estejam relacionadas com os domínios funcionais que podem conferir a atividade biológica das enterotoxinas estudadas. As regiões constantes foram observadas, em grande maioria, nas seqüências das amostras analisadas, conforme indicam os Anexos de 01 a 10.

Quando todas as linhagens foram submetidas à análise pelo programa MEME (BAILEY e ELKAN, 1994), a fim de verificar os domínios (regiões de seqüências conservadas), o que foi observado é que todas as linhagens possuem pelo menos três regiões conservadas em nível de nucleotídeo, quando comparadas com a cepa padrão *B. cereus* ATCC 14579.

O que varia entre as linhagens e a cepa padrão é justamente a posição destes domínios, sendo que algumas linhagens apresentaram distâncias maiores entre eles, e outras com distâncias menores. Esta mesma linha de raciocínio foi observada quando as linhagens foram comparadas entre si. Além disso, muitas linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram domínios duplicados, porém distantes entre si. Outras linhagens apresentaram domínios duplicados, mas estes se achavam translocados em outras regiões das seqüências de DNA.

Além de ter sido verificado a presença de regiões constantes, as amostras de *B. thuringiensis* revelaram no sequenciamento grande variabilidade tanto no início quanto no término das seqüências. Esta variabilidade observada é passível de ocorrer devido sua proximidade com os iniciadores (*forward* e *reverse*), em decorrência de artefatos do próprio método de sequenciamento. Regiões variáveis de início e término de sequenciamento são mostradas nos anexos de 01 a 07.

Foi observada também a presença de regiões variáveis no meio das seqüências de *B. thuringiensis* analisadas. Geralmente, a presença de variabilidade no meio das seqüências das amostras deve-se, provavelmente, às mutações que estas linhagens de *B. thuringiensis* sofreram como parte do processo evolutivo, visto que mutações são comuns entre grupos de microrganismos, principalmente bactérias, como forma de se adaptarem a novos ambientes.

Esta variabilidade no meio das seqüências pode ser observada através da presença de

gaps, como também a ocorrência de mutações no DNA analisado que podem ser vistas por meio de duplicações, inversões ou substituições de bases, por exemplo. As alterações nas sequências são mostradas nos Anexos de 01 a 07.

Depois que foi feita a análise das sequências de nucleotídeos no programa *CLC Sequence Viewer* através da ferramenta CLUSTALW e feita a comparação das amostras com a sequência da cepa padrão, teve-se a idéia de comparar também as sequências de aminoácidos de cada enterotoxina pesquisada. Este tipo de análise foi realizado para verificar se as proteínas que estes genes sintetizam nas linhagens de *B. thuringiensis* são similares às proteínas produzidas por *Bacillus cereus*.

Os dados revelaram que as sequências de aminoácidos, tais quais as sequências de nucleotídeos, apresentaram variabilidade no início das mesmas. Entretanto, a região localizada na porção central do fragmento permaneceu conservada para a maioria das amostras.

A grande maioria das linhagens analisadas, a partir do momento que foram feitos os alinhamentos globais, apresentou o que pode supor que sejam *stop codons*. Estes possíveis *stop codons* não estavam distribuídos uniformemente. Em algumas linhagens, eles se encontravam no início da sequência de aminoácidos, em outras estavam localizados na região central ou no fim da sequência.

A presença de *stop codons* nas sequências compromete a funcionalidade da proteína em estudo, pois se sabe que a atividade biológica de NHE e HBL é observada somente quando os seus três componentes são sintetizados, já que para estas duas proteínas é necessário que todos os seus componentes estejam na forma ativa, sem que sua tradução seja comprometida por *stop codons*. Este mesmo raciocínio é válido para a proteína BceT.

Entretanto, a fim de comprovar se realmente nas sequências analisadas existem alterações importantes como, por exemplo, *stop codons* ou mutações não silenciosas, faz-se necessário realizar uma análise de sequenciamento mais minuciosa, com um maior número de vezes, e, de preferência, com os iniciadores nas duas direções.

Porém, como este trabalho visou fazer um estudo de homologia entre as sequências das linhagens de *B. thuringiensis* com as sequências depositadas no banco de dados, o sequenciamento foi feito uma única vez e, por isso, é possível que estes *stop codons*, observados nas sequências de aminoácidos das enterotoxinas NHE, HBL e BceT, sejam artefatos de sequenciamento (defeito) e, não necessariamente, um término real de tradução.

Ademais, para saber se as proteínas das amostras analisadas correspondiam às proteínas codificadas pelos genes de enterotoxinas, foi utilizado a plataforma do Pfam

(www.pfam.sanger.ac.uk/search) e InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/), onde foi verificado que as sequências de aminoácidos das linhagens de *B. thuringiensis*, que estavam em boas condições de serem analisadas, realmente correspondiam às sequências de proteínas depositadas no banco de dados do Pfam e InterProScan.

A variabilidade das sequências de proteínas observadas nas linhagens de *B. thuringiensis*, provavelmente, deve-se às mutações que esta espécie deve ter sofrido no processo evolutivo, em que pese que estes bacilos habitantes do solo tiveram de se adaptar a novas condições do ambiente, como forma de garantir a perpetuação da espécie e de se adequar a um ambiente que está em constante mudança como é o caso do solo.

Em geral, a análise do alinhamento em nível de proteína revelou que as linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram variabilidade de aminoácidos, notadamente observada no início do sequenciamento, mas também são dotadas de regiões conservadas que estão localizadas praticamente na parte central do sequenciamento.

Apesar de se ter conseguido identificar sequências de aminoácidos de algumas enterotoxinas (no caso, L₁, L₂ e NheA) em diferentes linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas, não se pode afirmar que essas linhagens produzem estas enterotoxinas, pois para isso seria necessário detectar a atividade biológica e realizar testes bioquímicos e imunológicos.

É importante ressaltar que as amostras de *Bacillus thuringiensis* estudadas não foram provenientes de nenhum tipo de alimento ou surtos tóxico-alimentares e, sim, foram oriundas de variadas fontes, tais como solo, lama, insetos mortos, plantas entre outros. Os resultados fornecidos por esta pesquisa mostram que os genes codificadores das três principais enterotoxinas (BceT, HBL e NHE) encontram-se largamente distribuídos em estirpes de *B. thuringiensis* encontradas em ambientes naturais.

Este trabalho forneceu um melhor conhecimento das enterotoxinas presentes nas linhagens amazônicas de *Bacillus thuringiensis*, e pode oferecer, também, subsídio para o desenvolvimento de um *kit* de diagnóstico molecular para detecção de fatores de virulência em novos isolados de *Bacillus*.

7. CONCLUSÕES

1. As linhagens de *B. thuringiensis* isoladas no Estado do Amazonas apresentaram perfis distintos de amplificação para os genes de enterotoxinas pesquisados, onde: 78% das linhagens foram positivas para *bceT*; 77% para *hblA*; 65% para *hblD*; 84% para *hblC*; 63% para *nheA*; 59% para *nheB*; e 67% foram positivas para *nheC*;
2. A caracterização genotípica das 100 linhagens estudadas determinou que 41% foram positivas para todos os genes de enterotoxinas, enquanto apenas 3% delas foram negativas para todos os genes;
3. Uma média de 70,43% do total das linhagens de *B. thuringiensis* foi positiva para ao menos um dos sete genes de enterotoxinas pesquisados;
4. O alinhamento global das sequências de nucleotídeos das linhagens de *B. thuringiensis* mostrou que as mesmas possuem uma região muito conservada e de alta identidade com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank;
5. O alinhamento global das sequências de aminoácidos das proteínas L₁, L₂ e NheA mostrou que as linhagens de *B. thuringiensis* possuem regiões similares com as sequências de aminoácidos disponíveis no banco de dados do Pfam e InterProScan.

8. PERSPECTIVAS

- Proceder análise mais completa das seqüências dos genes de enterotoxinas estudados nas linhagens de *B. thuringiensis*;
- Desenvolver um *kit* de diagnóstico molecular a fim de detectar esse conjunto de enterotoxinas em outros isolados de *Bacillus* ou de gêneros bacterianos diferentes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMEED, A.; LANDEN, R. Studies on *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Swedish soils: insect toxicity and production of *Bacillus cereus*-diarrhoeal-type enterotoxin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 406-409, 1994.
- AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. **Microbiology**, v. 141, p. 983-988, 1995.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3^a edição. Porto Alegre: Artmed. 1997. 1294p.
- AL-KHATIB, M. S.; KHYAMI-HORANI, H.; BADRAN, E.; SHEHABI, A. A. Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 383-387, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANKOLEKAR, C.; RAHMATI, T.; LABBÉ, R. G. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U. S. rice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 460-466, 2008.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *B. thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, v. 50, n. 1, p. 1-24, 1986.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, n. 1, p. 1-8, 2001.
- ASANO, S. I. *et al.* Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, 1997.
- BAILEY, T. L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **Proceedings for Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**, p. 28-36, In: AAAI Press, California, 1994.
- BARRETO, Marliton Rocha. **Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja**. 2005. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus*

cereus group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v. 25, p. 588-596, 2008.

BEECHER, D. J.; MacMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 1778-1784, 1991.

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 980-986, 1994.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infec. Immun.**, v. 63, p. 4423-4428, 1995.

BERLINER, E. Ueber die schlafsucht der *Ephestia kuhniella* und *Bac. thuringiensis* n. sp. **Z. Angew. Entomol.**, v. 2, p. 21-56, 1915.

BOURQUE, S. N.; VALERO, J. R.; LAVOIE, M. C.; LEVESQUE, R. C. Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1623-1626, 1995.

BRAVO *et al.* Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRILLARD, J.; LERECLUS, D. Comparison of cytotoxin *cytK* promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain. **Microbiology**, v. 150, p. 2699-2705, 2004.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 8ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins (eds.), 1974. 1246p.

CÂMARA, Sônia Aparecida Viana. 2002. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001**. 2002. 79 f. Monografia de Especialização em Gestão em Saúde. Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande.

CARLSON, C. R.; JOHANSEN, T.; KOLSTØ, A-B. The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, p. 163-167, 1996.

CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G. W.; EVOLAS, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal activity of *B.thuringiensis* strains by polymerase chain reaction

profiles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 3057-3061, 1991.

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers direct to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *B. thuringiensis* collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CHAK, K.F.; CHOW, C. D.; KAO, K.K.; FENG, T.Y. Determination and distribution of cry-type genes of *B. thuringiensis* isolate from Taiwan. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 2415-2420, 1994.

CONN, H.J.; BARTHOLOMEU, J.W.; JENNISON, M.W. Staining methods. IN: **Manual of Microbiological Methods**, p. 37, 1957.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CRUMP, B. C.; ARMBRUST, E. V.; BARROS, J. A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3192-3204, 1999.

DAFFONCHIO, D.; CHERIF, A.; BORIN, S. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers described genetic relationships in the *Bacillus cereus* group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 5460-5468, 2000.

DAMGAARD, P. H.; LARSEN, H. D.; HANSEN, B. M.; BRESCIANI, J.; JØRGENSEN, K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 146-150, 1996.

DANSON, J. W.; KIMANI, M.; MBOGORI, M. Detection of *Bacillus thuringiensis* genes in transgenic maize by the PCR method and FTA paper technology. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 22, p. 2345-2349, 2006.

DROBNIIEWSKI, F. A. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 101-109, 1994.

DU, C.; MARTIN, P. A. W. & NICKERSON, K. W. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and non-insecticidal *B. thuringiensis* protein crystal. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3847-3853, 1994.

EHLING-SCHULZ *et al.* Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. **Microbiology**, v. 151, p. 183-197, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHAN, A.; BERG, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxin and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 60, . 232-240, 2006.

FAGERLUND, A.; LINDBÄCK, T.; STORSET, A. K.; GRANUM P. E.; HARDY, S. P. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. **Microbiology**, v. 154, p. 693-704, 2008.

GAVIRIA RIVERA, A. M.; GRANUM, P. E.; PRIEST, F. G. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 151-155, 2000.

GAZIT, E.; SHAI, Y. The assembly and organization of the organization of the α -5 and α -7 helices from pore-forming domain of *B. thuringiensis* δ -endotoxin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 2571-2578, 1995.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 129-134, 2002.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; FISCARELLI, E.; SENESI, S. *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 591-598, 2007.

GRANUM, P. E.; ANDERSSON, A.; GAYTHER, C.; TEGIFFEL, M.; LARSEN, H.; LUND, T.; O'SULLIVAN, K. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 141, p. 145-149, 1996.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 225-229, 1999.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. Symposium Series - **Society for Applied Bacteriology**: 61S-66S, 1994.

GRAY, K. M.; BANADA, P. P.; O'NEAL, E.; BHUNIA, A. K. Rapid Ped-2E9 cell based cytotoxicity analysis and genotyping of *Bacillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5865-5872, 2005.

GUAYCURUS; T. V.; FREITAS J. P.; RABINOVITCH, L.; VICENTE. M. M. A. Resultados preliminares sobre a incidência de *Bacillus cereus* em alimentos industrializados. **Ciência & Cultura, supl.** v. 35;p. 3-4, 1983.

GUAYCURUS, T. V.; SIMONE S. G.; RABINOVITCH L. Isolamento parcial de enterotoxinas de sobrenadantes de cultura de *Bacillus cereus*. **Ciência & Cultura, supl.**, v. 34, n. 7, p. 7-8, 1987.

GUAYCURUS, T.V.; RABINOVITCH, L.; VAECK, M.; BARJAC, H. de. Isolamento de *B.thuringiensis* de solos brasileiros. *IN: Anais do 1º Simpósio de Controle Biológico*, Rio de Janeiro, 1988.

GUAYCURUS, T.V. **Caracterização clássica e molecular de isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* e clonagem molecular do gene *cry* de *Bacillus thuringiensis* subspécie *israelensis* (NI-99)**. 1991. Tese de mestrado. Universidade de Brasília.

GUAYCURUS, T. V.; VICENTE, A. C.; De SIMONE, S. G.; RABINOVITCH, L. Partial isolation and some properties of enterotoxin produced by *B.cereus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 131-134, 1993.

GUAYCURUS, Thania Verginia. **Controle biológico de mosquitos com *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, modelo alemão, e pesquisa de genes *cry* em linhagens auto-aglutinantes**. 1999. 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília.

GUINEBRETIERE, M.-H.; BROUSSOLLE, V.; NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3053-3056, 2002.

GUTTMANN, D. M.; ELLAR, D. J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 7-13, 2000.

HAN *et al.* Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3382-3390, 2006.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 185-189, 2001.

HEINRICHS, J. H.; BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 6760-6766, 1993.

HELGASON, E.; CAUGANT, D. A.; OLSEN, I.; KOLSTØ, A-B. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1615-1622, 2000.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN, B. M.; JOHANSEN, J. E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 239-249, 2006.

HSIEH, Y. M.; SHEU, S. J.; CHEN, Y. L.; TSEN, H. Y. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 481-490, 1999.

ISHIWATA, S. On a type of severe flacherie (sotto disease). **Dainihon Sanshi Kaiho**, v. 114, p. 1-5, 1901 (Original in Japanese).

INT VELD, P. H.; RITMEESTER, W. S.; DELFGOU-VAN ASCH, E. H. M.; DUFRENNE, J. B.; WERNARS, K.; SMIT, E.; VAN LEUSDEN, F. M. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 63-70, 2001.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.

JENSEN, G. B.; LARSEN, P.; JACOBSEN, B. L.; MADSEN, B.; WILCKES, A.; SMIDT, L.; ANDRUP, L. Isolation and characterization of *Bacillus cereus*-like bacteria from faecal samples from greenhouse workers who are using *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 75, p. 191-196, 2002.

KALYAN KUMAR, T. D.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Construction of a non toxic chimeric protein (L₁-L₂-B) of Haemolysin BL from *Bacillus cereus* and its application in HBL toxin detection. **Journal of Microbiological Methods**, 2008.

KAO, S. S.; HSIEH, F. C.; TZENG, C. C.; TSAI, Y. S. Cloning and expression of the insecticidal crystal protein gene Cry1Ca9 of *Bacillus thuringiensis* G10-01A from Taiwan granaries. **Current Microbiology**, v. 47, p. 295-299, 2003.

KIM, Y.-R.; BATT, C. A. Riboprint and virulence gene patterns *Bacillus cereus* and related species. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 1146-1155, 2008.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *B. thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.**, v. 24, p. 275-308, 1994.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 189-198, 2000.

KUBOTA, Y.; OHGUSHI, A.; UEMORI, A.; MIZUKI, E.; OHBA, M. Identification of two haemolysins in larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the bean bug, *Riptortus clavatus*. **J. Appl. Entomol.**, v. 130, n. 3, p. 183-189, 2006.

KUO, WHITE-SHANG; CHAK, KIN-FU. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1369-1377, 1996.

KYEI-POKU, G.; GAUTHIER, D.; PANG, A.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Detection of *Bacillus cereus* virulence factors in commercial products in *Bacillus thuringiensis* and expression of diarrheal enterotoxins in a target insect. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

LIGHTWOOD, D. J.; ELLAR, D. J.; JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 12, p. 5174-5181, 2000.

LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A.; RODLANDT, M. S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology**, v. 150, p. 3959-3967, 2004.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterization of a nonhaemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 141, p. 151-156, 1996.

MADEGOWDA, M.; ESWARAMOORTHY, S.; BURLEY, S. K.; SWAMINATHAN, S. X-ray crystal structure of the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Proteins**, v. 71, n. 2, p. 534-540, 2008.

MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1634-1639, 1998.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.

McKILLIP, J. L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 393-399, 2000.

MENDES, R. A.; AZEREDO, R. M. C. de; COELHO, A. I. M.; OLIVEIRA, S. S. de; COELHO, M. do S. L. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 255-261, 2004.

MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors

on human intestinal epithelial cells. **J. Food Protec.**, v. 64, n. 10, p. 1535-1541, 2001.

MINNAARD, J.; DELFEDERICO, L.; VASSEUR, V.; HOLLMANN, A.; ROLNY, I.; SEMORILE, L.; PÉREZ, P. F. Virulence of *Bacillus cereus*: a multivariate analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 197-206, 2007.

MORAVEK, M.; DIETRICH, R.; BUERK, C.; BROUSSOLLE, V.; GUINEBRETIERE, M-H.; GRANUM, P. E.; NGUYEN-THE, C.; MÄRTLBAUER, E. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 257, p. 293-298, 2006.

MOSS, M. O. Microbial Food Poisoning. *In: Assays in agricultural and food microbiology*. Norris, J. R. & Pettipher, G. L. (eds): New York, 1987, p. 369-399.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NGAMWONGSATIT, P.; BUASRI, W.; PIANARIYANON, P.; PULSRIKARN, C.; OHBA, M.; ASSAVANIG, A.; PANBANGRED, W. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK* and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 353-356, 2008.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.**, v. 84, p. 51S-61S, 1998.

OMBUI, J. N.; SCHMIEGER, H.; KAGIKO, M. M.; ARIMI, S. M. *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 245-248, 1997.

OUOBA, L. I. I.; THORSEN, L.; VARNAM, A. H. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 224-230, 2008.

PERANI, M.; BISHOP, A. H.; VAID, A. Prevalence of β -exotoxin, diarrhoeal toxin and specific δ -endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 160, p. 55-60, 1998.

PINTO, A. F. M. A. Papel dos microrganismos na produção e na transformação de alimentos. **Terra Fértil**, v. 1, p. 55-61, 1996.

PHELPS, R. J.; MCKILLIP, J. L. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3147-3151, 2002.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P. da; FIUZA, L. M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solo e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 209-214, 2004.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 5, p. 419-432, 2003.

PRÜß, B. M.; DIETRICH, R.; NIBLER, B.; MÄRLTBAUER, E.; SCHERER, S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5436-5442, 1999.

RICE, W. C. Specific primers for the detection of *vip3A* insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 378-382, 1999.

RYAN, P. A.; MACMILLAN, J. D.; ZILINSKAS, B. A. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v. 179, p. 2551-2556, 1997.

SANGADALA, S. F.; ENGLISH, L. H.; ADANG, M. J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *B. thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 10088-10092, 1994.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SERGEEV, N.; DISTLER, M.; VARGAS, M.; CHIZHIKOV, V.; HEROLD, K. E.; RASOOLY, A. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 488-502, 2006.

SHINAGAWA, K.; SUGIYAMA, J.; TERADA, T.; MATSUSAKA, N.; SUGII, N. Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 80, p. 1-6, 1991.

SONG, Fuping *et al.* Identification of *cryII*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cryII*-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5207-5211, 2003.

SOUZA-FILHO, A. **Isolamento e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* do Estado do Amazonas**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Estado do Amazonas.

STARNBACH, M. N.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **Journal Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1257-1261, 1989.

STENFORS, L. P.; GRANUM, P. E. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 223-228, 2001.

STENFORS, L. P.; MAYR, R.; SCHERER, S.; GRANUM, P. E. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 215, p. 47-51, 2002.

SVENSSON, B.; MONTHÁN, A.; GUINEBRETIERE, M-H.; NGUYEN-THÉ, C.; CHRISTIANSSON, A. Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1201-1208, 2007.

SWAMINATHAN, S.; FUREY, W.; PLETCHER, J.; SAX, M. Residues defining V beta specificity in staphylococcal enterotoxins. **Nat. Struct. Biol.**, v. 2, n. 8, p. 680-686, 1995.

SWIECICKA, I.; VAN DER AUWERA, G. A.; MAHILLON, J. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 544-551, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THAENTHANE, S.; WONG, A. C. L.; PANBANGRED, W. Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 203-212, 2005.

TOJO, A.; AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 576-580, 1983.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

WALLACE, R. B.; SHAFFER, J.; MURPHY, R. F.; BONNER, J.; HIROSE, T.; ITAKURA, K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to X 174 DNA: the

effect of single base pair mismatch. **Nucleic Acids Research**, v. 6, n. 11, p. 3543-3558, 1979.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Microbial Pest Control Agent: *Bacillus thuringiensis*. **Environmental Health Criteria 217**. Geneva: 1999, 125p.

YUAN, Z.; HANSEN, B. M.; ANDRUP, L.; EILENBERG, J. Detection of enterotoxin genes in mosquito-larvicidal *Bacillus* species. **Current Microbiology**, v. 45, p. 221-225, 2002.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J. Comput. Biol.**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZHOU, G.; LIU, H.; HE, J.; YUAN, Y.; YUAN, Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 195-200, 2008.

Anônimo. Assunto: **Microscopy and staining: the Gram stain**. Sítio: http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displaychapter&chap_id=39&theme=printer. Acesso em: 16/06/2008.

Anônimo. Assunto: **Enterotoxin**. Sítio: <http://en.wikipedia.org/wiki/Enterotoxin>. Acesso em: 16/06/2008.

ANEXOS

ANEXO 01:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *bceT***

Modo Identidade - bceT

Bacillus/1-371	ATCAAATTTGGAGTAACTCGAAATTCAAACTAGCATTAAA	62
BtAM35/1-362	ATCAA. .TTGGAGTA. CTCTCGAAAT. .CAACTAGCATTAAA	55
BtAM156/1-320	ATCAA. TTTGGAGTA. CTCTCGAAAT. CGTACTAGCACTAAA	56
BtAM134/1-366	ACAA. . .TTGGAGTA. CCGGAAGT. CGTACTAGCATTAAA	55
BtAM18/1-356	ATCAAATTT. GGAGTA. CTCTCGAAAT. CAAACTAGCATTAAA	58
BtAM28/1-358	TTAAACAATGGAGTACCCTCGAAATC. . .AACTAGCATTAAA	57
consensus	atcAa. .ttGGAGTA. CtCTCGAAat. .c. aACTAGCAtTAAA	
Bacillus/1-371	AGTTCAAAAATACGT. CAGATAGTAAATGAAATCTTAAAAAC	101
BtAM35/1-362	G. .TCAAAAATACGT. CAGATAGTAAATGAAATTTTAAAAAC	92
BtAM156/1-320	AG. TCAAAAATACG. T CAGATAGTAACTGAAATTT. AAAAAAC	93
BtAM134/1-366	AG. TCAAAAATACNGT CAGATAGTAACTGAAATTTTAAAAAC	94
BtAM18/1-356	GGT. CAAAATACGTAA CAGATAGTAAATGAAATTTTAAAAAC	97
BtAM28/1-358	G. .TCAAAAATACGT. CAGATAGTAACTGAAATTTTAAAAAC	94
consensus	.g. tCAAAAATACgt. CAGATAGTA. TGAAATtTtAAAAAC	
Bacillus/1-371	GCCAG. ATGCTGCTGAAATTACATTACCAGGACGTGCTTA	140
BtAM35/1-362	ACCGG. ATGCTGCTGAAATTACATTACCAGGACGTGCTTA	131
BtAM156/1-320	ACCAAG. ATGCTGCTGAAATTACATTACCAGGACGTGCTTA	132
BtAM134/1-366	ACCGGGATGCTGCTGAAATTACGTGACCAGGACGTGCTTA	134
BtAM18/1-356	ACCGG. ATGCTGCTGAAATTACATTACCAGGACGTGCTTA	136
BtAM28/1-358	ACCGG. ATGCTGCTGAAATTACATTACCAGGACGTGCTTA	133
consensus	aCCgG. ATGCTGCTGAAATTACaTtACCAGGACGTGCTTA	
Bacillus/1-371	CTTACAAGTTGGGAATAATGAAATTTATGAACTATTCCAA	180
BtAM35/1-362	CTTACAAGTTGGGAATAATGAAATATATGAACTATTCCAA	171
BtAM156/1-320	CTTACAAGTTGGGAATAATGAAATTTATGAACTATTCCAA	172
BtAM134/1-366	CTTACAAGTTGGGAATAATGAAATTCATGAACTATTCCAA	174
BtAM18/1-356	TTTACAAGTTGGGAATAATGAAATTTATGAACTATTCCAA	176
BtAM28/1-358	CTTACAAGTTGGGAATAATGAAATATATGAACTATTCCAA	173
consensus	cTTACAAGTTGGGAATAATGAAATtTATGAACTATTCCAA	
Bacillus/1-371	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT. AGAAACAACAAAGAG	219
BtAM35/1-362	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT. AGAANACAAAGAA	210
BtAM156/1-320	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT TAGAATACAAAGAG	212
BtAM134/1-366	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT. AGAATATAAAGAG	213
BtAM18/1-356	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT. AGAAACAACAAAGAG	215
BtAM28/1-358	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT. AGAATACAAAGAA	212
consensus	TCAGCTTGGAGCGGAGCAGACTATGT. AGAA. AaAAAGAg	
Bacillus/1-371	GATAAAGAACATTTAGACGCAACA. AT. CTATGCAATAAAA	257
BtAM35/1-362	GATCAAGAACATTTAGATGCAACG. AT. GTATGCAATAAAA	248
BtAM156/1-320	GATAAAGAAGATTTAGACTCAACA. TT. CTATGCTATATA	250
BtAM134/1-366	GATAAAGAACATTTGATCCACA. TTGCTATGCTATACA	252
BtAM18/1-356	GATAAAGAACATTTGACGCAACA. AT. CTATGCAATAAAA	253
BtAM28/1-358	GATAAAGAACGTTTCGATGCAACAGATGGTATGCAATAAAA	252
consensus	GATaAAGAaCaTTT. GA. gCaACa. aT. cTATGCaATAaA	

Bacillus/1-371	TGATCTAGGA	CAATA	TGAAATATT	AAGTGAAGATT	TTAAGT	297
BtAM35/1-362	TGATCTAGGA	CAATA	TGAAATATT	AAGTGAAGATT	TTAAGT	288
BtAM156/1-320	TGATCTAGGA	GAATA	TGAGATATT	AAGTGAAGATT	TTAAGT	290
BtAM134/1-366	TGATCTAGGA	GCATC	TGAGTTATT	CAGTGAAGAC	TTAAGT	292
BtAM18/1-356	TGATCTAGGA	GAATA	TGAAATATT	AAGTGAAGAC	TTAAGT	293
BtAM28/1-358	TGATCTAGGA	CAATA	TGAAATATT	AAGTGAAGAT	ATAAGT	292
consensus	TGATCTAGGA	.aATa	TGAaa	TATTa	AGTGAAGAtt	TAAGT

Bacillus/1-371	GGC	CCTTGGTAGCAG.	TAAAGAAGTAATAAG	326		
BtAM35/1-362	GGACTTGGTAGT	AG.	TAAAGAAGTAATAAG	317		
BtAM156/1-320	GGACTTGGTAGCAGT	TA.	AGAAGTA.	TTAA	318	
BtAM134/1-366	GGACTTGGTAGCAGC	TAGAGAAGTT.	TACG	321		
BtAM18/1-356	GGACTTGGTAGCAG.	TAAAGAAGTACTAAG	322			
BtAM28/1-358	GGACTTGGTAGT	AATTA.	GGAAGTTTACG	321		
consensus	GGa	CCTTGGTAGc	Ag.	TA.	aGAAGTa.	Taag

X non conserved
X $\geq 50\%$ conserved
X all match

ANEXO 02:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *hblA***

Modo Identidade - hblA

Bacillus/1-352	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	121
BtAM19/1-349	GGGTGCTATNTTGGGTCTACCAATAATTAGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	120
BtAM32/1-348	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAAGTATTGCGGT	TCATAGTGGGAGTAG	114
BtAM10/1-335	GGGTGCTATNTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	107
BtAM102/1-344	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTAGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	111
BtAM03/1-352	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	119
BtAM35/1-337	GGGTGCTATNTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	107
BtAM07/1-335	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	109
BtAM28/1-306	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	112
BtAM01/1-338	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	110
BtAM06/1-332	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	104
BtAM36/1-343	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	109
BtAM135/1-355	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	120
BtAM49/1-311	AGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	103
BtAM156/1-347	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	116
BtAM18/1-334	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	103
BtAM61/1-331	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	103
BtAM09/1-330	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	101
BtAM134/1-302	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	110
BtAM155/1-275	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	119
BtAM24/1-284	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	121
BtAM153/1-272	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	114
BtAM12/1-266	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	109
BtAM118/1-278	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	121
BtAM40B/1-256	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	99
BtAM133/1-278	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	119
BtAM116/1-257	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	113
BtAM87/1-223	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	107
BtAM39/1-276	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	120
BtAM73/1-257	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	112
BtAM122/1-256	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	114
BtAM55/1-272	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	114
BtAM108/1-263	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	112
BtAM99/1-287	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	119
BtAM158/1-249	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	107
BtAM15/1-272	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	113
BtAM23/1-226	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	105
BtAM50/1-242	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	103
BtAM124/1-282	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	120
BtAM95/1-251	GGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGCGGTA	TATAGTGGGAGTAG	103
consensus	gGgtGctatTTTGGGTcTACcaAataattgCGGTA	TcATAGTggGAGTAG	

Bacillus/1-352	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	170
BtAM19/1-349	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGT	AAGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	169
BtAM32/1-348	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	163
BtAM10/1-335	CNAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	156
BtAM102/1-344	CACGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	160
BtAM03/1-352	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	168
BtAM35/1-337	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	156
BtAM07/1-335	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	158
BtAM28/1-306	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	161
BtAM01/1-338	CAGGGGA	.TAA	TTAGGT	NAGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	159
BtAM06/1-332	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	153
BtAM36/1-343	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	158
BtAM135/1-355	CAAGGGA	.TAA	TTAGGT	GTAGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	169
BtAM49/1-311	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	152
BtAM156/1-274	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	165
BtAM18/1-334	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	152
BtAM61/1-331	CANGGGA	.TAA	TTAGGT	CAGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	152
BtAM09/1-330	CAAGGGA	.TAA	TTAGGT	NAGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	150
BtAM134/1-302	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	159
BtAM155/1-275	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	168
BtAM24/1-284	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	170
BtAM153/1-272	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	163
BtAM12/1-266	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	158
BtAM118/1-278	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	170
BtAM40B/1-256	CAAGGGAG	.TAA	GTTAGGTA	AGTT	AGAGT	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	149
BtAM133/1-278	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	168
BtAM116/1-257	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	162
BtAM87/1-223	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	156
BtAM39/1-276	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	169
BtAM73/1-257	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	161
BtAM122/1-256	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	163
BtAM55/1-272	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	163
BtAM108/1-263	AAGGGAG	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	160
BtAM99/1-287	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	168
BtAM158/1-249	CAAGGGA	.GAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	156
BtAM15/1-272	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	162
BtAM23/1-226	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	154
BtAM50/1-242	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	152
BtAM124/1-282	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	169
BtAM95/1-251	CAAGGGA	.TAA	TTAGGTA	AGTT	AGAGC	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	152
consensus	caaGGga	.tAA	TtAGGta	AGTt	AGAGc	CTTT	ATTAGCAGA	ATT	ACGTCA	

Bacillus/1-352	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	220
BtAM19/1-349	GACCGTGGATAATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTAGCTTACA	219
BtAM32/1-348	GACCGTGTATTATAAAGTAACTTCAATCGTGTAGTTTGAGTTGCTTACA	213
BtAM10/1-335	GACCGTGGATAATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTAGAGTTGCTTACA	206
BtAM102/1-344	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTCAATCGTGTAGTTCCGAGTTGCTTACA	210
BtAM03/1-352	GACTGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	218
BtAM35/1-337	GACTGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	206
BtAM07/1-335	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	208
BtAM28/1-306	GACTGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	211
BtAM01/1-338	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTNAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	209
BtAM06/1-332	GACTGTGGATAATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	203
BtAM36/1-343	GACCGTGGATAATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	208
BtAM135/1-355	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTNGAGTTGCTTACA	219
BtAM49/1-311	GACTGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTAGAGTTGCTTACA	202
BtAM156/1-347	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTNAATCGTGTAGTTCCGAGTTGCTTACA	215
BtAM18/1-334	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	202
BtAM61/1-331	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTNAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	202
BtAM09/1-330	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	200
BtAM134/1-302	GACCGTGGATAATAAAGTAACTTCAATCGTGTAGTTCCGAGTTGCTTACA	209
BtAM155/1-275	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	218
BtAM24/1-284	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	220
BtAM153/1-272	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTACATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	213
BtAM12/1-266	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	208
BtAM118/1-278	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	220
BtAM40B/1-256	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	199
BtAM133/1-278	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	218
BtAM116/1-257	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	212
BtAM87/1-223	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	206
BtAM39/1-276	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	219
BtAM73/1-257	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	211
BtAM122/1-256	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	213
BtAM55/1-272	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	213
BtAM108/1-263	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTAGCTTACA	210
BtAM99/1-287	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	218
BtAM158/1-249	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	206
BtAM15/1-272	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTAGGAGTAGCTTACA	212
BtAM23/1-226	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGATTACA	204
BtAM50/1-242	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	202
BtAM124/1-282	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTNGAGTTGCTTACA	219
BtAM95/1-251	GACCGTGGATTATAAAGTAACTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACA	202
consensus	GACCGTGGATtATAAAGTAAcCtTaaATcGTGTAgTtgGAGTtGcTTACA	

Bacillus/1-352	G. TAATATTAATGA	233
BtAM19/1-349	G. TAATATTAATGA	232
BtAM32/1-348	G. TAATATTAATGA	226
BtAM10/1-335	G. TAATATTAATGA	219
BtAM102/1-344	G. TAATATTAATGA	223
BtAM03/1-352	G. TAATATTAATGA	231
BtAM35/1-337	G. TAATATTAATGA	219
BtAM07/1-335	G. TAATATTAATGA	221
BtAM28/1-306	G. TAATATTAATGA	225
BtAM01/1-338	G. TAATATTAATGA	222
BtAM06/1-332	G. TAATATTAATGA	216
BtAM36/1-343	G. TAATATTAATGA	221
BtAM135/1-355	G. TAATATTAATGA	232
BtAM49/1-311	G. TAATATTAATGA	215
BtAM156/1-347	G. TAATATTAATGA	228
BtAM18/1-334	G. TAATATTAATGA	215
BtAM61/1-331	G. TAATATTAATGA	215
BtAM09/1-330	G. TAATATTAATGA	213
BtAM134/1-302	G. TAATATTAATGA	222
BtAM155/1-275	G. TAATATTAATGA	231
BtAM24/1-284	G. TAATATTAATGA	233
BtAM153/1-272	G. TAATATTAATGA	226
BtAM12/1-266	G. TAATATTAATGA	221
BtAM118/1-278	G. TAATATTAATGA	233
BtAM40B/1-256	G. TAATATTAATGA	212
BtAM133/1-278	G. TAATATTAATGA	231
BtAM116/1-257	G. TAATATTAATGA	225
BtAM87/1-223	G. TAATATTAATGA	219
BtAM39/1-276	G. TAATATTAATGA	232
BtAM73/1-257	G. TAATATTAATGA	224
BtAM122/1-256	G. TAATATTAATGA	226
BtAM55/1-272	G. TAATATTAATGA	226
BtAM108/1-263	G. TAATATTAATGA	223
BtAM99/1-287	G. TAATATTAATGA	231
BtAM158/1-249	G. TAATATTAATGA	219
BtAM15/1-272	G. TAATATTAATGA	225
BtAM23/1-226	G. TAATATTAATGA	217
BtAM50/1-242	G. TAATATTAATGA	215
BtAM124/1-282	G. TAATATTAATGA	232
BtAM95/1-251	G. TAATATTAATGA	215
consensus	G. TaATATtaAtga	

X non conserved
 X ≥ 50% conserved
 X all match

ANEXO 03:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *hblD***

Modo Identidade - hbd

Bacillus/1-354	TATACGACACAT	TAGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	127
BtAM35/1-355	TATACGACACAT	TAGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	128
BtAM06/1-346	TATACGACACAT	AGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	119
BtAM134/1-345	TATACGACACAT	AGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	118
BtAM10/1-344	TATACGACACAT	AGTAGA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCA.GTCTAAAAG	118
BtAM14/1-348	TATACGACACAT	AGTAGAT	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAAGTCTAAAAG	121
BtAM27/1-347	TATACGACACAT	AGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	120
BtAM135/1-351	AATAACGACACAT	AGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAAGTCTAAAAG	122
BtAM113/1-354	TATACGACACAT	TAGTAGAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	127
BtAM28/1-336	TATAC.GACA.AT	AGTGA.A	ACTGTA	.AAAAGAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	110
BtAM49/1-333	TATTA.GACA.AT	AGTAAA	.A.TGTA	.AAAAGAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	106
BtAM61/1-315	TATAG...ACA	A.TATAAA	.A.TGTACA	GA...AGATA	GGAGTT...AAA	93
BtAM124/1-345	TATACGACACAT	AGTAAA	ACTGTACAAA	GAAAGATA	GGCAGGTCTAAAAG	118
consensus	tAT.acgacAcAt	.agTagA	.AcTGTAcAAA	gaaAgATA	.GGcAggTctaaAAG	

Bacillus/1-354	AGGGCATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	182
BtAM35/1-355	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	183
BtAM06/1-346	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	174
BtAM134/1-345	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	173
BtAM10/1-344	AGGGTATAAAT	GATTTAAT	CACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	173
BtAM14/1-348	AGGGTATAAAT	GATTTAAT	CACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	176
BtAM27/1-347	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	175
BtAM135/1-351	AGGGTATAAAT	AATAAAT	CACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	177
BtAM113/1-354	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	182
BtAM28/1-336	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	165
BtAM49/1-333	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	161
BtAM61/1-315	GAAGTATAAAT	A...TTAATT	ACTACA	TCATACAAAT	CAAAGAAGTTACAGA	143
BtAM124/1-345	AGGGTATAAAT	GATTTAATT	ACTACAAT	CAATACAAAT	TCAAAGAAGTTACAGA	173
consensus	agGGtATAAaTgat	ttAATt	ACTACAa	TCATACAAATt	CAAAGAAGTTACAGA	

Bacillus/1-354	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	235
BtAM35/1-355	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	236
BtAM06/1-346	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	227
BtAM134/1-345	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	226
BtAM10/1-344	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCCAATTTCTGCAG	226
BtAM14/1-348	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	TATATCCAAATTTCTGCAG	229
BtAM27/1-347	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	228
BtAM135/1-351	TAGTAC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATACTACAG	232
BtAM113/1-354	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	235
BtAM28/1-336	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	218
BtAM49/1-333	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	214
BtAM61/1-315	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	196
BtAM124/1-345	T.GTC	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	CTATATCAAATTTCTACAG	226
consensus	T.GTg	.ATTAAGATGCT	ACAAGACTTCAA	AGGGAAA	cTATATCaaAATtTcTaCAG	

Bacillus/1-354	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	290
BtAM35/1-355	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	291
BtAM06/1-346	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	282
BtAM134/1-345	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	281
BtAM10/1-344	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	281
BtAM14/1-348	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	284
BtAM27/1-347	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	283
BtAM135/1-351	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	287
BtAM113/1-354	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	290
BtAM28/1-336	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	273
BtAM49/1-333	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	269
BtAM61/1-315	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	251
BtAM124/1-345	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATGGG	AAAGGTGG	TTAACTGCAATATT	281
consensus	ATTTTAAAAA	TAATGTTGGTGGT	CCAGATgGG	AaaGGTGGaTt	AaCtGCaATATT	

Bacillus/1-354	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	344
BtAM35/1-355	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTTAAATTGAGCAACTTCG	345
BtAM06/1-346	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCTTG	.CCTAAATTGAGCAACTTCG	336
BtAM134/1-345	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	335
BtAM10/1-344	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	GCTGAAATTGAGCAACTTCG	336
BtAM14/1-348	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	338
BtAM27/1-347	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	337
BtAM135/1-351	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	341
BtAM113/1-354	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	344
BtAM28/1-336	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	327
BtAM49/1-333	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	323
BtAM61/1-315	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	305
BtAM124/1-345	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	335
consensus	AGCAGGTCAACAGGCAACGATTCCACAACCTTCAAG	.CTGAAATTGAGCAACTTCG	

Bacillus/1-354	TGC	347
BtAM35/1-355	TTC	348
BtAM06/1-346	TTC	339
BtAM134/1-345	TTC	338
BtAM10/1-344	TTC	339
BtAM14/1-348	TTC	341
BtAM27/1-347	TTC	340
BtAM135/1-351	TTC	344
BtAM113/1-354	TTC	347
BtAM28/1-336	TTC	329
BtAM49/1-333	TTC	326
BtAM61/1-315	TTC	308
BtAM124/1-345	TTC	338
consensus	TtC	

X| non conserved
X ≥ 50% conserved
X all match

ANEXO 04:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *hblC***

Modo Identidade - hbIC

Bacillus/1-666	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGATA	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	50
BtAM08/1-664	AATCGTTTGTAGACATAAAGAAGAC	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	46
BtAM27/1-662	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM61/1-658	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM49/1-663	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM135/1-646	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM35/1-649	.ATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
BtAM28/1-632	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	44
BtAM05/1-638	AATCGTTTGTAGACATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	46
BtAM18/1-614	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAG	AGAAAGGGTTTCGGATAGACTG	44
BtAM156/1-612	AATCGTTTGTAGACATAAAGAAGA	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	46
BtAM03/1-593	.AATGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	43
BtAM06/1-584	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM118/1-548	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	.GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
BtAM159/1-526	.ATCGTTTGTAGACATAAAGAAGATA	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTG	46
BtAM153/1-503	.ATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	45
BtAM19/1-485	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGA	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTG	45
BtAM36/1-488	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
BtAM40A/1-474	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGATA	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	50
BtAM75/1-470	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
BtAM40B/1-470	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	AGAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM01/1-476	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM10/1-466	AATCGTTTGTAGACNATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM55/1-416	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	AGAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
BtAM154/1-391	AAACGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	AGAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
BtAM14/1-390	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	49
BtAM32/1-380	AATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	44
BtAM102/1-350	AATCGTTTGGT.GACAGTAA.GAAGA	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	44
BtAM108/1-317	AATCGTTTGTAGACATAAAGAAGAT	GAGAAGGGTTTCGGATAGACTT	48
consensus	aAtcGTTtGTaGAc.aTAAagAagat.gagaagGgttt.cGGATAGACTt		

Bacillus/1-666	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	100
BtAM08/1-664	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	96
BtAM27/1-662	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	99
BtAM61/1-658	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGACCTCAAGAAAATACGCAACGGCA	99
BtAM49/1-663	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	99
BtAM135/1-646	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATAACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	99
BtAM35/1-649	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	98
BtAM28/1-632	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	93
BtAM05/1-638	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	94
BtAM18/1-614	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	93
BtAM156/1-612	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	96
BtAM03/1-593	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	91
BtAM06/1-584	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	99
BtAM118/1-548	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	98
BtAM159/1-526	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	95
BtAM153/1-503	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	95
BtAM19/1-485	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACC	94
BtAM36/1-488	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACG	98
BtAM40A/1-474	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	100
BtAM75/1-470	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	98
BtAM40B/1-470	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	99
BtAM01/1-476	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATAACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	99
BtAM10/1-466	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	99
BtAM55/1-416	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	98
BtAM154/1-391	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	98
BtAM14/1-390	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	99
BtAM32/1-380	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACN	94
BtAM102/1-350	.AAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAATGCGCAACGACG	93
BtAM108/1-317	GAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATGCGCAACGACA	98
consensus	gAAGTACTTcAAGAAATGGCTATgACGAaTCAAGAAaATgCGCAACGAcA	

Bacillus/1-666	AATCAATGAATTAACAGAACTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	150
BtAM08/1-664	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	146
BtAM27/1-662	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM61/1-658	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM49/1-663	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATTTAAAAATTTAAAG	149
BtAM135/1-646	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM35/1-649	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	148
BtAM28/1-632	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	143
BtAM05/1-638	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	144
BtAM18/1-614	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	143
BtAM156/1-612	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	146
BtAM03/1-593	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	141
BtAM06/1-584	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM118/1-548	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTGGATAAAAAATTTAAAG	148
BtAM159/1-526	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	145
BtAM153/1-503	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	145
BtAM19/1-485	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	144
BtAM36/1-488	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATCAAAAAATTTCAAAG	148
BtAM40A/1-474	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	150
BtAM75/1-470	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	148
BtAM40B/1-470	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTGGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM01/1-476	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM10/1-466	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	149
BtAM55/1-416	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	148
BtAM154/1-391	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	148
BtAM14/1-390	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATCAAAAAATTTCAAAG	149
BtAM32/1-380	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTNAAAG	144
BtAM102/1-350	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTGACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	143
BtAM108/1-317	AATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAATTTAAAG	148
consensus	AATCAATGAATTAACAGAtCTTAAATtACAGCTtGAtaAAAAATtaAAAg	

Bacillus/1-666	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	199
BtAM08/1-664	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	195
BtAM27/1-662	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM61/1-658	ATTTTGATACTGATGTGGCAACTGCGCAAGG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM49/1-663	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM135/1-646	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM35/1-649	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	197
BtAM28/1-632	ATTTTGATACTAATGTGGNCAC.GCGCAAGG.	GCATACTAAGTACAGATGG	190
BtAM05/1-638	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	193
BtAM18/1-614	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	192
BtAM156/1-612	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	195
BtAM03/1-593	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	190
BtAM06/1-584	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM118/1-548	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	197
BtAM159/1-526	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	194
BtAM153/1-503	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	194
BtAM19/1-485	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	193
BtAM36/1-488	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAGT	GCATACTAAGTACAGATCG	198
BtAM40A/1-474	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	199
BtAM75/1-470	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	197
BtAM40B/1-470	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM01/1-476	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM10/1-466	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM55/1-416	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	197
BtAM154/1-391	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGGCAAG.	GGATACTAAGTACAGATGG	197
BtAM14/1-390	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	198
BtAM32/1-380	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	193
BtAM102/1-350	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	192
BtAM108/1-317	ATTTTGATACTAATGTGGCAACTGCGCAAG.	GCATACTAAGTACAGATGG	197
consensus	ATTTtGATACTaATGTGGcaActGcGCAaG.	GcATAcTAaGTACaGATgG	

Bacillus/1-666	AACAGGAAAAATAGATCAGTT.AAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	247
BtAM08/1-664	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	243
BtAM27/1-662	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM61/1-658	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM49/1-663	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM135/1-646	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM35/1-649	AACAGGAAAAATAGATCAGTT.AAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	245
BtAM28/1-632	AACCGGACAAATAGATCAGTT.TAAACAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	238
BtAM05/1-638	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	241
BtAM18/1-614	AACAGGAAAAATAGATCAGTT.AAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	240
BtAM156/1-612	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	243
BtAM03/1-593	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	238
BtAM06/1-584	AACAGGAAAAATAGATCAGTT.AAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM118/1-548	GACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	245
BtAM159/1-526	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	242
BtAM153/1-503	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	242
BtAM19/1-485	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	241
BtAM36/1-488	AACAGGACAAATAGATCAGTTCCAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM40A/1-474	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	247
BtAM75/1-470	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	245
BtAM40B/1-470	GACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM01/1-476	AACAGGACAAATAGATCAGTTCAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	247
BtAM10/1-466	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM55/1-416	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM154/1-391	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM14/1-390	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	246
BtAM32/1-380	AACAGGAAAAATAGATCAGTTCAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	242
BtAM102/1-350	AACAGGAAAAATAGATCAGTTCAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	240
BtAM108/1-317	AACAGGAAAAATAGATCAGTTAAAAAAT	GAAATATTAAT	ACCAAAAA	245
consensus	aACagGAaAAATaGATcAgTTaAAaAat	.GAAaTATTAaAT	.aCCaaAAA	

Bacillus/1-666	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACC	TGGAG	CTTTA	296
BtAM08/1-664	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	292
BtAM27/1-662	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	295
BtAM61/1-658	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	295
BtAM49/1-663	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	295
BtAM135/1-646	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	295
BtAM35/1-649	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	294
BtAM28/1-632	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	287
BtAM05/1-638	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	290
BtAM18/1-614	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	289
BtAM156/1-612	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	292
BtAM03/1-593	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	287
BtAM06/1-584	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	295
BtAM118/1-548	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	294
BtAM159/1-526	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	291
BtAM153/1-503	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	291
BtAM19/1-485	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	290
BtAM36/1-488	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	295
BtAM40A/1-474	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	296
BtAM75/1-470	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	294
BtAM40B/1-470	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	295
BtAM01/1-476	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	296
BtAM10/1-466	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	295
BtAM55/1-416	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	295
BtAM154/1-391	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	296
BtAM14/1-390	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	295
BtAM32/1-380	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGAG		CTTTA	291
BtAM102/1-350	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	289
BtAM108/1-317	AGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAATTCGATTAATACCAGGGG		CTTTA	294
consensus	AGCAATTCaAAATGATtTACAGCAaATTGCATTaATACCAGGaG		CTTTa	

Bacillus/1-666	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	320
BtAM08/1-664	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	316
BtAM27/1-662	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM61/1-658	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM49/1-663	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM135/1-646	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM35/1-649	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	318
BtAM28/1-632	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	311
BtAM05/1-638	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	314
BtAM18/1-614	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	313
BtAM156/1-612	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	316
BtAM03/1-593	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	311
BtAM06/1-584	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM118/1-548	AATGACAGGG.ATTTGCTATATT	318
BtAM159/1-526	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	315
BtAM153/1-503	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	315
BtAM19/1-485	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	314
BtAM36/1-488	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM40A/1-474	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	320
BtAM75/1-470	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	318
BtAM40B/1-470	AATGACAGGG.ATTTGCTATATT	319
BtAM01/1-476	AATGAGCAGGG.ATNTGCTATATTC	320
BtAM10/1-466	AATGACAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM55/1-416	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM154/1-391	AATGACAGGGCATTGCTATATTC	321
BtAM14/1-390	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	319
BtAM32/1-380	AATGAGCAGGG.ATTTGCTATATTC	315
BtAM102/1-350	AATGACAGGG.ATTGCTATATTC	313
BtAM108/1-317	AATGACAGGG.ATTTGCTATATT.	317
consensus	AATGA.CaGGG.ATttGCTATATTC	

X non conserved
X \geq 50% conserved
X all match

ANEXO 05:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *nheA***

Modo Identidade - nheA

Bacillus/1-421	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	117
BtAM01/1-405	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	111
BtAM14/1-412	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	117
BtAM08/1-418	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	114
BtAM27/1-416	TTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	112
BtAM10/1-420	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	115
BtAM49/1-406	TTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	109
BtAM156/1-415	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	112
BtAM03/1-411	TTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	109
BtAM28/1-408	TTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	109
BtAM06/1-359	TTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	108
BtAM35/1-416	TTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	107
BtAM102/1-403	TTTGCACAGCCAGA	CTTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	104
BtAM165/1-405	TTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	112
BtAM61/1-412	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	110
BtAM05/1-405	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	102
BtAM135/1-412	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	108
BtAM19/1-361	TTTGCACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	107
BtAM18/1-408	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	109
BtAM36/1-414	TTTGGCAACAGCCAGA	ACTTAAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	110
BtAM134/1-358	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	107
BtAM37/1-415	TTTTACAAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	113
BtAM85/1-310	TTTTACAAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	105
BtAM40A/1-385	TTTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TGAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	109
BtAM142/1-373	TTTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TGAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	110
BtAM40E/1-412	TTTTACAAACAGCCAGA	TATTAAGG	TGAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	109
BtAM63/1-393	TTTTACAAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	115
BtAM55/1-370	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TGAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	116
BtAM32/1-332	TTTGGCAACAGCCAGA	CTTAAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	119
BtAM40B/1-300	TATTGGCAACAGCCAGA	ATTAAGG	GAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	106
BtAM161/1-434	TTTGGCAACAACAGCCAGA	CATTAAGG	TGAATGCTATGAGCAGTTTAACGAATCAT	116
BtAM24/1-279	TTTGGCAACAGCTTGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	108
BtAM12/1-277	TTTGGCAACAGCCAGA	CATTAAGG	TAAATGCGATGAGTAGCTTAACGAATCAT	113
consensus	TtttgcAaCagCcaGA	caTTAAgG	taAaTGcGATGAGtAGcTtaACGAATCAT	

Bacillus/1-421	CAAAAGTTcGCAAAGGCCAATGTGCGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	171
BtAM01/1-405	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	165
BtAM14/1-412	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	171
BtAM08/1-418	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	168
BtAM27/1-416	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	166
BtAM10/1-420	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	169
BtAM49/1-406	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	163
BtAM156/1-415	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	166
BtAM03/1-411	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	163
BtAM28/1-408	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATAT	CCGAAG	163
BtAM06/1-359	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	162
BtAM35/1-416	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATCAT	CCGAAG	161
BtAM102/1-403	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACAGAGTGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	156
BtAM165/1-405	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAATGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	166
BtAM61/1-412	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAT	CCGAAG	164
BtAM05/1-405	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	156
BtAM135/1-412	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	162
BtAM19/1-361	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAT	CCGAAG	161
BtAM18/1-408	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	163
BtAM36/1-414	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	165
BtAM134/1-358	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	161
BtAM37/1-415	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTAAAGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	167
BtAM85/1-310	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTAAAGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	159
BtAM40A/1-385	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTAAAGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	163
BtAM142/1-373	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTAAAGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	164
BtAM40E/1-412	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTAAAGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	163
BtAM63/1-393	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTAAAGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	169
BtAM55/1-370	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	170
BtAM32/1-332	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATGAT	CCGAAG	173
BtAM40B/1-300	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	160
BtAM161/1-434	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTGCGAGAGTGGATTGATGAATATNAT	CCGAAG	170
BtAM24/1-279	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	162
BtAM12/1-277	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	167
consensus	CAAAAGTTTGCAAAGGCCAATGTACGAGAGTGGATTGATGAATATAAT	CCGAAG	

Bacillus/1-421	CTAATTGACTTAAATCAAGAATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	226
BtAM01/1-405	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	220
BtAM14/1-412	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	226
BtAM08/1-418	CTTATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	223
BtAM27/1-416	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	221
BtAM10/1-420	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	224
BtAM49/1-406	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	218
BtAM156/1-415	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCAATAGATTTAATAGCTATT	221
BtAM03/1-411	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	218
BtAM28/1-408	CTTATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	218
BtAM06/1-359	CTCATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGCTATT	217
BtAM35/1-416	CTNATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	216
BtAM102/1-403	CTCATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	211
BtAM165/1-405	CTCATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGCTATT	221
BtAM61/1-412	CTCATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGCTATT	219
BtAM05/1-405	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCAATAGATTTAATAGCTATT	211
BtAM135/1-412	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCAATAGATTTAATAGCTATT	217
BtAM19/1-361	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	216
BtAM18/1-408	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	218
BtAM36/1-414	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	220
BtAM134/1-358	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	216
BtAM37/1-415	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGTATTAGATTTAATAGTTCTTT	222
BtAM85/1-310	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGTATTAGATTTAATAGTTATT	214
BtAM40A/1-385	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGTACTAGATTTAATAGTTATT	218
BtAM142/1-373	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGTACTAGATTTAATAGTTATT	219
BtAM40E/1-412	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGTACTAGATTTAATAGTTATT	218
BtAM63/1-393	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGTATTAGATTTAATAGTTCTTT	224
BtAM55/1-370	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	225
BtAM32/1-332	CTCATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTCTTT	228
BtAM40B/1-300	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCAATAGATTTAATAGCTATT	215
BtAM161/1-434	TTAATCGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATATAGCAATAGATTTAATAGCTATT	225
BtAM24/1-279	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTC AATAGTTATT	217
BtAM12/1-277	CTAATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCAATAGATTTAATAGCTATT	222
consensus	cTaATTGACTTAAATCAAGAGATGATGAGATACAGCACTAGATTTAATAGCTATT	

Bacillus/1-421	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	269
BtAM01/1-405	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	263
BtAM14/1-412	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATCAAGATCA	269
BtAM08/1-418	ATAGTAA	GCTCTATAAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	266
BtAM27/1-416	ATAGTAA	GCTCTATGAAITAGCAGGAAA	CGTAAATAAAGATCA	264
BtAM10/1-420	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	267
BtAM49/1-406	ATAGTAA	GCTCTATGAAITAGCAGGAAA	CGTAAATCAAGATCA	261
BtAM156/1-415	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	264
BtAM03/1-411	ATAGTAA	GCTCTATGAAITAGCAGGAAA	CGTAAATCAAGATCA	261
BtAM28/1-408	ATAGTAA	GCTCTATGAAITAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	261
BtAM06/1-359	ATAGTAA	GCTCTATGAAITAGCAGGAAA	CGTAAATCAAGATCA	260
BtAM35/1-416	ATAGTAA	GCTCTATGAAITAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	259
BtAM102/1-403	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	254
BtAM165/1-405	ATAGTAA	GCTCTATCAAITAGCAGGAAA	CGTAAATCAAGATCA	264
BtAM61/1-412	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	262
BtAM05/1-405	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	254
BtAM135/1-412	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CGTAAATCAAGATCA	260
BtAM19/1-361	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATCAAGATCA	259
BtAM18/1-408	ATAGTAA	GCTCTATAAACTAGCAGGAAA	TGTAAATCAAGATCA	261
BtAM36/1-414	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATCAAGATCA	263
BtAM134/1-358	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	259
BtAM37/1-415	ACAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CATAAATGAAGATCA	265
BtAM85/1-310	ACAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CATAAATGAAGATCA	257
BtAM40A/1-385	ACAGTAA	GCTCGGTGAACTAGCATGCAAC	CGTAAATCAGGATCA	261
BtAM142/1-373	ACAGTAA	GCTCTGTGAACTAGCAGGAA	CGTAAATGAGGATCA	262
BtAM40E/1-412	ACAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAA	CGTAAATGAGGATCA	261
BtAM63/1-393	ACAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CATAAATCAAGATCA	267
BtAM55/1-370	ATAGTAA	GCTCTGGGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	268
BtAM32/1-332	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	TGTACATGAAGATCA	271
BtAM40B/1-300	ATAGTAA	GCTCTGTGAACTAGCAGGAAA	CGTAAATGAAGATCA	258
BtAM161/1-434	ATAGTAA	CCTGTGTGAAITTAACAGGAAA	AAATAAATGAAGATCA	269
BtAM24/1-279	ATAGTAA	GCTCGATGAACTAGCAGGAAA	TGTAAATGAAGATCA	260
BtAM12/1-277	ATAGTAA	GCTCTATGAACTAGCAGGAAA	CGTCGCTGAAGATCA	265
consensus	AtAGTAA	GCTctatgAAcTAGCAGgAAA	cgTaaaTgAaGATca	

X non conserved
X ≥ 50% conserved
X all match

ANEXO 06:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *nheB***

Modo Identidade - nheB

Bacillus/1-714	TTATAATGACTATGAAGAATACTCATTAGGACCAGAAGGCTTGAAAGATGCAATG	121
BtAM08/1-701	TTATAAT. ACTAT. .AGAATATC. .TAGGACCAGAAGG. TTGAAAGATGCA. TG	109
BtAM27/1-690	TTATA. TGACTAA. AAGAATATC. ATTAGGACCAGAAGGCCTAAAAGATGCAATG	115
BtAM35/1-725	TTATA. TGACTAT. AAGAATATC. ATTAGGACCAGAAGGCCTAANAGATGCAATG	117
BtAM134/1-668	TTATA. TGACTAT. AAGAATATC. ATTAGGACCAGAAGGCTTGAAAGATGCAATG	118
BtAM124/1-634	TTATA. TGACTATGAAGAATAT. CATTAGGACCAGAAGGCTTGAAAGATGCAATG	115
BtAM28/1-586	T. ATA. TGACTAT. AGAAAT. . C. AT. AGGACCAGAAGGCCTAAAAGATGCAATG	112
BtAM49/1-536	TTATAATGACTAT. AAGAATATC. ATTAGGACCAGAAGGCCTAAAAGATGCAATG	120
BtAM32/1-496	TTATA. TA. ACTATAAAGAATATTCATTAGGACCAGAAGGTTTGAAAGATGCAATG	114
BtAM144/1-415	TTATCATGACTATCAGGAATACTCATTAGGACCAGAAGGCCTAAAAGATGCAATG	125
BtAM136/1-389	TTATAATA. ACTATNAAGAATATTCATCAGGACCAGAAGGTTTGAAAGATGCAATG	118
BtAM36/1-355	TTATAATGACTATGAAGAATAT. CATTAGGACCAGAAGGCTTGAAAGATGCAATG	118
consensus	TtATa. TgACTAt. aagAATat. . attAGGACCAGAAGGctTgAaAGATGCAaTG	
Bacillus/1-714	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. GTAATGGATCTGTACGCTTTAAACAATTAT	174
BtAM08/1-701	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. CTAATGGATCTGTATGCTTTAAACAATTAT	162
BtAM27/1-690	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. NTAATGGATCTGTACGCTTTAAACAATTAT	168
BtAM35/1-725	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. NTAATGGATCTGTACGCTTTAAACAATTAT	170
BtAM134/1-668	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. GNTAATGGATCTGTATGCTTTAAACAATTAT	172
BtAM124/1-634	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. GCTA. CTGGATCTGTATGCTTTAAACAATTAT	169
BtAM28/1-586	.GAAAGAACAGGT. CAAATGCTT. A. GTAATGGAT. TGTA. C. GCTTTAAACAATTAT	162
BtAM49/1-536	.GAAAGAACAGGT. CAAATGCTTTA. NTAATGGATCTGTACGCTTTAAACAATTAT	172
BtAM32/1-496	.GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. GCTAT. TGGATCTGTATGCTTTAAACAATTAT	168
BtAM144/1-415	.GAAAGAACAGGT. CAAA. C. GCTTTA. G. TAATGGATCTGTACGCTTTAAACAATTAT	177
BtAM136/1-389	C. GAAAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. G. TAATGGATCTGTATGCTTTAAACAATTAT	172
BtAM36/1-355	.GANAGAACAGGTTCAAATGCTTTA. G. TAATGGATCTGTATGCTTTAAACAATTAT	171
consensus	. GAaAGAACAGGTtCAAAtGCTTtA. . TAaTGGATtCTGTa. GCTTTAAACAATTAT	
Bacillus/1-714	TAAACAAGGTAATGTTAACTTTGGAAATGTATCGTCTGTTGAT. GCGGCTTTAAA	228
BtAM08/1-701	TAAAC. CAGGTAATGTTAACTTTGGAAATGTATCGA. CTGTTAAT. GCAC. CTTTAAA	216
BtAM27/1-690	TAAACAAGGTAATG. GTTAACTTTGGAAATGTATCGTCTGTTGAT. GCGGCTTNTAA	222
BtAM35/1-725	TAAACAAGGTCATGNTAACTTTGGAAATGTATCGTCTGTTGAT. GCGGCTTCTAC	224
BtAM134/1-668	TAAACAAGGTAATGTCTAACTTTGGAAATGTATCGA. CTGTTGAT. GCAGCTTTAAA	226
BtAM124/1-634	TAAACAAGGTAATGTTCACTTTGGAAATGTATCGA. CTGTTGAT. C. GCGGCTTT. AA	223
BtAM28/1-586	. AAACAAGGTA. CTGTTAACTTTGGAAATGTATCGTCTGTTGAT. GCGGCTTT. AA	214
BtAM49/1-536	TAAACAAGGTAATG. GTTAACTTTGGAAATGTATCGTCTGTTGAT. GCGGCTTTAAA	226
BtAM32/1-496	TAAACAAGGTAATGTTCACTTTGGAAATGTATCGA. CTGTTGAT. GCAGCTTCTIAA	222
BtAM144/1-415	TAAACAAGGGAATGTTAACTTTGGAAATGTATCAT. CTGTTGAT. GCGGCTTTAAA	231
BtAM136/1-389	TAAACAAGGTAATGTTAACTTTGGAAATGTATCGA. CTGTTGAT. GCAGCTTTAAA	226
BtAM36/1-355	TAAACAAGGTAATGTTAACTTTGGAAATGTATCGA. CTGTTGAT. GCAGCTTTAAA	225
consensus	tAAACaAGGtaAtggtt. ACTTTGGAAATGTATCg. CTGTTgAT. GC. gCTTtAaA	
Bacillus/1-714	AGGCAAAGTAATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGC. AATGGTT	282
BtAM08/1-701	.GGAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGC. AATGGTT	269
BtAM27/1-690	AGGCAAAGTAATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGAAATGCGAAGC. AATGGTT	276
BtAM35/1-725	AGGCAAAGTAATTCAGCACCAAGATACAGCTNGAGAAATGCGAAGC. AATGGTT	278
BtAM134/1-668	AGGAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTNGAGAAATGCGAAGC. AATGGTT	280
BtAM124/1-634	AGGAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTTGAGGAAATGCGAAGC. AATGGTC	277
BtAM28/1-586	AGGCAAAGTAATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGAAATGCGAAGC. AATGGTT	268
BtAM49/1-536	AGGCAAAGTAATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGAAATGCGAAGC. AATGGTT	280
BtAM32/1-496	AGGAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTC. GAGGAAATGCGAAGC. CAT. GGTTC	276
BtAM144/1-415	AGGCAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGC. AATGGTT	285
BtAM136/1-389	AGGAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTAGAGGAAATGCGAAGC. AATGGTT	281
BtAM36/1-355	AGGAAAGTGATTCAGCACCAAGATACAGCTGAGGAAATGCGAAGC. AATGGTT	279
consensus	aGG. AAAGTgATTCAGCACCAaGATACAGCTaGAGgAaATGCGAAGC. AttGGTt	

```

Bacillus/1-714 AGAT.GTA.TTAAAACCACAGC.TTATTTCAAC..GA 314
BtAM08/1-701 AGAT.GTA.TTAAAGCCACAGC.TTATTTCAAC..GA 301
BtAM27/1-690 AGAT.GTA.TTAAAACCACAGC.TTATTTCAAC..GA 308
BtAM35/1-725 AGAT.GTA.TTAAAACCACAGC.TTATTTCAAC..GA 310
BtAM134/1-668 AGAT.CTA.TTAAAGCCACAGC.TTATTTCAAC..GA 312
BtAM124/1-634 AGAT.GTATTTAAAGCCACAGCC.TTATTTCAACCGAA 313
BtAM28/1-586 AGAT.GTA.TTAAAACCACAGC.TTATTTCAAC..GA 300
BtAM49/1-536 AGAT.GTA.TTAAAACCACAGC.TTATTTCAAC..GA 312
BtAM32/1-496 AGAT.GTA.TTAAAGCC.CAGC.TTATTTCAAC..AA 307
BtAM144/1-415 AGAT.GTA.TTGAAGCCACAGC.TTATTTCAAC..GA 317
BtAM136/1-389 AGATCGTAATTAAAGCCACAGC.TCATTTC AAC..GA 315
BtAM36/1-355 AGAT.GTA.TTAAAGCCACAGC.TTATTTCAAC..GA 311
consensus AGAT.gTA.TtaAa.CCaCAGC.TtATTTCAaC..gA

```

X non conserved
X ≥ 50% conserved
X all match

ANEXO 07:**Alinhamento em modo identidade das sequências de nucleotídeos do gene *nheC***

Modo Identidade - nheC

Bacillus/1-549	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCTGGATTCCAAGATGTAATGGCACAAAACGA	121
BtAM03/1-536	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCTGGATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	113
BtAM28/1-536	GTGAAAA.TATNCTCTTGGACCAGCTG.ATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	109
BtAM27/1-540	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCTG.ATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	111
BtAM49/1-540	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCTGGATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	112
BtAM35/1-540	GTGAAAA.TATCTCTCTTGGACCAGCTGGATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	112
BtAM134/1-538	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCC.A.GATGTAATGGCACAAAACGA	110
BtAM10/1-532	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCC.A.GATGTAATGGCACAAAACGA	111
BtAM102/1-516	GTGAAAACTATNCTCTTGGACCAGCAGGATCC.A.GATGTAATGGCACAAAACGA	111
BtAM05/1-534	GTGAAAA.TATNCTCTTGGACCAGCAGGATCC.A.GATGTAATGGCACAAAACGA	116
BtAM01/1-533	GTGAAAACTATNCTCTTGGACCAGCAGGATCC.A.GATGTAATGGCACAAAACGA	111
BtAM36/1-525	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCC..AGATGTAATGGCACAAAACGA	117
BtAM135/1-526	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCC..AGATGTAATGGCACAAAACGA	114
BtAM08/1-518	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	115
BtAM18/1-520	GTGAAAA.TATNCTCTTGGACCAGCAGGATCC.A.GATGTAATGGCACAAAACGA	109
BtAM129/1-521	ATGAAAA.TATCTCTCTTGGACCAGCTGGATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	111
BtAM156/1-509	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	117
BtAM14/1-510	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCAGGATCCA..AGATGTAATGGCACAAAACGA	113
BtAM12/1-415	GTGAAAACTATCTCTTGGACCAGCATGACCA..AGATGTAATGGCACAAAACGA	117
BtAM32/1-515	.TGAAAACTATNCTCTTGGACCAGCAGGATCC..AGATGTAATGGCACAAAACGA	110
BtAM25/1-416	GT.AAAAACTATNCTCTTGGACCAGCAG.ATCC.AAGATGTAATGGCACAAAACGA	115
consensus	gTgAAAAA cTAT. CTCTTGGACCAGCaggAtcc. aaGATGTAATGGCACAAAACGA	

Bacillus/1-549	CATCAAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	175
BtAM03/1-536	CATCGAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	168
BtAM28/1-536	CATCGAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	163
BtAM27/1-540	CATCGAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	165
BtAM49/1-540	CATCGAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	166
BtAM35/1-540	CATCGAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	166
BtAM134/1-538	CATCAAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	164
BtAM10/1-532	CATCNAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	165
BtAM102/1-516	CATCNAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	165
BtAM05/1-534	CATCAAGCATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	170
BtAM01/1-533	CATCAAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	165
BtAM36/1-525	CATCNAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	171
BtAM135/1-526	CATCAAGCATATNTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	168
BtAM08/1-518	CATCAAGCATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	169
BtAM18/1-520	CATCAAGTATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	163
BtAM129/1-521	CATCAAGCATATNTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	165
BtAM156/1-509	CATCAAGCATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	171
BtAM14/1-510	CATCNAGCATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	167
BtAM12/1-415	CATCAAGCATATNTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	171
BtAM32/1-515	CATCNAGCATATTTGCAATGG.ATTCATATGC. AAAATTNATTCAANAATCAACNAG	164
BtAM25/1-416	CATCAAGCATATTTGCAATGG.ATTCATATGCAAAAATTAATTCAAAATCAACAAG	169
consensus	CATC. AG. ATATtTGCAATGG. ATTCATATGCaAAATTaATTCAaAATCAACaAG	

Bacillus/1-549	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	229
BtAM03/1-536	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	222
BtAM28/1-536	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTTAA	.	GGGAAT	TATGA	216
BtAM27/1-540	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	220
BtAM49/1-540	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	220
BtAM35/1-540	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	220
BtAM134/1-538	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	218
BtAM10/1-532	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	219
BtAM102/1-516	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	219
BtAM05/1-534	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	224
BtAM01/1-533	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	CA	AGGAAT	TATGA	219
BtAM36/1-525	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	225
BtAM135/1-526	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	222
BtAM08/1-518	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGA	GATGA	223
BtAM18/1-520	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	217
BtAM129/1-521	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	T	GATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA
BtAM156/1-509	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	225
BtAM14/1-510	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGA	GATGA	221
BtAM12/1-415	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGAAT	TATGA	225
BtAM32/1-515	AGACGGATTTAA	.GTAN	AATAAGTT	CGATN	AATAGT	GAATTT	AAA	GGGA	GATGA	218
BtAM25/1-416	AGACGGATTTAA	.GTAAAAA	TAAGTT	CGATTA	AATAGT	GAATTT	CA	AGGAAT	TATGA	223
consensus	AGACGGATTTAA	.GTAA	aATAAGTT	cGATt	AATAGT	GAATt	TaAa	GGGAa	TATGA	

Bacillus/1-549	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	284
BtAM03/1-536	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	277
BtAM28/1-536	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	271
BtAM27/1-540	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	275
BtAM49/1-540	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	275
BtAM35/1-540	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	275
BtAM134/1-538	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	273
BtAM10/1-532	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	274
BtAM102/1-516	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	274
BtAM05/1-534	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	279
BtAM01/1-533	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAAT	274
BtAM36/1-525	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	280
BtAM135/1-526	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	277
BtAM08/1-518	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	278
BtAM18/1-520	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	272
BtAM129/1-521	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAAT	274
BtAM156/1-509	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	280
BtAM14/1-510	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	276
BtAM12/1-415	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	280
BtAM32/1-515	TTCAGCATCAAAGAGATGCAAAAATTAATGCAGCATATTGGTTAAATAATATGAA	273
BtAM25/1-416	TTCAGC	278
consensus	TTCAGCaTCAAAGAGATGCAAAAATtAATGCaGCATATTGGTtAAaTaaTaTGaA	

Bacillus/1-549	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	335		
BtAM03/1-536	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	328		
BtAM28/1-536	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	322		
BtAM27/1-540	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	326		
BtAM49/1-540	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	326		
BtAM35/1-540	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	326		
BtAM134/1-538	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCA	N	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	324		
BtAM10/1-532	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	325		
BtAM102/1-516	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	325		
BtAM05/1-534	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	330		
BtAM01/1-533	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	325		
BtAM36/1-525	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	331		
BtAM135/1-526	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	328		
BtAM08/1-518	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	329		
BtAM18/1-520	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	323		
BtAM129/1-521	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	G	GATCAA	.	.AATATTAT	.CAATAATACTTT	325		
BtAM156/1-509	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	331		
BtAM14/1-510	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	327		
BtAM12/1-415	GCC	.TCAAATTATGAAAAC	CAGATCAA	.	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	331		
BtAM32/1-515	GCC	.CTCT	ATTATGAAAAC	CAGATCA	N	.	.AATATTATAAATTA	.CAATAATACTTT	324	
BtAM25/1-416	ACC	TCAA	CTTATGAAA	CCC	GATCC	CTC	ACTATTATAAAT	CA	CAATAATACTTT	333
consensus	gCC	.tcaaa	TTATGAAA	aaCa	GATCaa	.	AaTATTATaAATtA	.CaATAATACTtT		

Bacillus/1-549	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	381
BtAM03/1-536	TCAATCGTATT..ATAAC..GACTTGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	374
BtAM28/1-536	TCAATCGTATT..ATAAC..GACTTGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	368
BtAM27/1-540	TCAATCGTATT..ATAAC..GACTTGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	372
BtAM49/1-540	TCAATCGTATT..ATAAC..GACTTGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	372
BtAM35/1-540	TCAATCGTATT..ATAAC..GACTTGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	372
BtAM134/1-538	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTNA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	370
BtAM10/1-532	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	371
BtAM102/1-516	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	371
BtAM05/1-534	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	376
BtAM01/1-533	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	371
BtAM36/1-525	TCAATCGTATT..ATAAT..GACTTGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	377
BtAM135/1-526	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTNA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	374
BtAM08/1-518	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	375
BtAM18/1-520	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	369
BtAM129/1-521	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	371
BtAM156/1-509	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	377
BtAM14/1-510	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTTA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	373
BtAM12/1-415	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	377
BtAM32/1-515	TCAATCGTATT..ATAAT..GACATGTTAA..TAGC..GATTGA..TCAAAAAGGAT	379
BtAM25/1-416	CCACCGCGATC..TCAAT..CACCTGTCAC..CAGC..CATTACTCCCCCTCCAC	380
consensus	tCAAtCGtAtt..atAAt..gACaTGttaa..tAGC..gATTGa.tCaaaaGgAt	

Bacillus/1-549	ACCGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	415
BtAM03/1-536	ACCGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	408
BtAM28/1-536	ACCGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	402
BtAM27/1-540	ACCGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	406
BtAM49/1-540	ACCGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	406
BtAM35/1-540	ACCGGANNAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	406
BtAM134/1-538	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	404
BtAM10/1-532	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	405
BtAM102/1-516	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	405
BtAM05/1-534	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	410
BtAM01/1-533	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	405
BtAM36/1-525	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	411
BtAM135/1-526	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	408
BtAM08/1-518	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	409
BtAM18/1-520	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	403
BtAM129/1-521	ACCGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	405
BtAM156/1-509	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	411
BtAM14/1-510	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATCTTGAAAGTTGT	407
BtAM12/1-415	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	411
BtAM32/1-515	AGTGGAAAATTAA..AAGCGGATTTAGAAAAGTTGT	414
BtAM25/1-416	ACTTCCCACCCTCTCCACTCCACACCTAAAA..CNNN	414
consensus	AgTggaaAatTaa..aagcggAtttagAAAAGttgt	

- X non conserved
- X ≥ 50% conserved
- X all match

ANEXO 08:
**Alinhamento em modo similaridade das sequências de aminoácidos do
componente L₁ da hemolisina BL**

Modo Similaridade - L1

Componente L1

<i>Bacillus cereus</i>	ARN	I	V	N	Y	D	E	Q	F	Q	N	Y	D	T	L	V	E	T	V	Q	K	K	D	K	A	G	L	K	E	G	I	N	35
<i>BtAM113</i>	VXR	I	R	G	G	N	E	Q	F	Q	N	Y	D	T	L	V	E	T	V	Q	K	K	D	K	A	G	L	K	E	G	I	N	35
<i>BtAM14</i>	DKKD	V	V	C	N	R	I	K	F	K	I	I	R	H	I	V	D	T	V	Q	K	K	D	K	A	S	L	K	E	G	I	N	35
consensus	...	i	v	.	c	n	e	q	f	q	n	y	d	t	l	v	e	t	v	q	k	k	d	k	a	g	l	k	e	g	i	n	

Domínio HBL

Componente L1

<i>Bacillus cereus</i>	DL	I	T	T	I	N	S	K	E	V	T	D	V	I	K	M	L	Q	D	F	K	G	K	L	Y	Q	N	S	T	D	F	K	70
<i>BtAM113</i>	DL	I	T	T	I	N	S	K	E	V	T	D	V	I	K	M	L	Q	D	F	K	G	K	L	Y	Q	N	S	T	D	F	K	70
<i>BtAM14</i>	DL	I	T	T	I	N	S	K	E	V	T	D	V	I	K	M	L	Q	D	F	K	G	K	L	Y	P	N	S	A	D	F	K	70
consensus	DL	I	T	T	I	N	S	K	E	V	T	D	V	I	K	M	L	Q	D	F	K	G	K	L	Y	q	N	S	t	D	F	K	

Domínio HBL

Componente L1

<i>Bacillus cereus</i>	NN	V	G	P	D	G	K	G	G	L	T	A	I	L	A	G	Q	Q	A	T	I	P	Q	L	Q	A	E	I	E	Q	L	R	A	105
<i>BtAM113</i>	NN	V	G	P	D	G	R	G	G	L	T	A	I	L	A	G	Q	Q	A	T	I	P	Q	L	Q	A	E	I	E	Q	L	R	S	105
<i>BtAM14</i>	NN	V	G	P	D	G	K	G	G	L	T	A	I	L	A	G	Q	Q	A	T	I	P	Q	L	P	A	E	I	E	Q	L	R	S	105
consensus	NN	V	G	P	D	G	k	G	G	L	T	A	I	L	A	G	Q	Q	A	T	I	P	Q	L	q	A	E	I	E	Q	L	R	s	

Domínio HBL

X| non conserved
 X similar
 X ≥ 50% conserved
 X ≥ 80% conserved

ANEXO 09:
Alinhamento em modo similaridade das sequências de aminoácidos do
component L₂ da hemolisina BL

Modo Similaridade - L2

Componente L2

Bacillus cereus	NKEDREGFSDRLEVLQEMAMTNQENAQRQINELTE	35
BtAM118	TIKKMRVSDRLEVLQEMAMTNQENAQRQINELTD	35
BtAM08	DIKKTRVSDRLEVLQEMAMTNQENAQRXINELTD	35
BtAM40A	NKEDREGFPDRLEVLQEMAMTNQENAQRQINELTD	35
BtAM156	DIKKREGFPDRLEVLQEMAMTNQENAQRXINELTD	35
consensus	.ikkregfsDRLEVLQEMAMTNQENAQRqINELTD	

Domínio HBL

Componente L2

Bacillus cereus	LKLQLDKKLDKDFDTNVATAQGILGTDGTGKIDQLK	70
BtAM118	LKLQLDKKLDKDFDTNVATAQGILSTDGTGKIDQLK	70
BtAM08	LKLQLDKKLDKDFDTNVATAQGILSTDGTGKIDQLK	70
BtAM40A	LKLQLDKKLDKDFDTNVATAQGILSTDGTGKIDQLK	70
BtAM156	LKLQLDKKLDKDFDTNVATAQGILSTDGTGKIDQLK	70
consensus	LKLQLDKKLDKDFDTNVATAQGILSTDGTGKIDQLK	

Domínio HBL

Componente L2

Bacillus cereus	NEILNTKKAIQNDLQQIALIPGALNEQGFAIFKEV	105
BtAM118	NEILNTKKAIQNDLQQIALIPGALNEQGFAIFKEV	105
BtAM08	NEILNTKKAIQNDLQQIALIPGALNEQGFAIFEV	105
BtAM40A	NEILNTKKAIQNDLQQIALIPGALNEQGFAIFKEV	105
BtAM156	NEILNTKKAIQNDLQQIALIPGALNEQGFAIFKEV	105
consensus	NEILNTKKAIQNDLQQIALIPGALNEQGFAIFKEV	

Domínio HBL

Componente L2

Bacillus cereus	YLSKEIIEPAAQAGVAAYNKGKEINNSILEAEKK	140
BtAM118	YLSKEIIEPAAQAGVAAYNKGKEINNSILEAENK	140
BtAM08	YLSKEIIEPAAQAGVAAYNRGKEINNSILEAEXK	140
BtAM40A	YLSKEIIEPAAQAGVAAYNKGKEITNSILEAEKK	140
BtAM156	YLSKEIIEPAAQAGVAAYNTGKEINNSFLEAENK	140
consensus	YLSKEIIEPAAQAGVAAYNkGKEINNSILEAE.K	

Componente L2

Bacillus cereus	AAQEATEQGKTAL	153
BtAM118	AVQEATEQGKTAL	153
BtAM08	AAXEATEQGQTAL	153
BtAM40A	AAHEATEHGKTAL	153
BtAM156	AAQEATEQGKTAL	153
consensus	AAqEATEQGKTAL	

- X non conserved
- similar
- X ≥ 50% conserved
- X ≥ 80% conserved

ANEXO 10:
Alinhamento em modo similaridade das sequências de aminoácidos do
componente A da enterotoxina NHE

Modo Similaridade - NheA

	<i>NheA</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	IRMLGSQSPLIQAYGLIILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM06</i>	PSINLGANHRLCEHMDNYLQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM19</i>	SIIRSGSYHRLSSIRITNYLQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM18</i>	PSLTWDYXTLIQHTGXIFCNSQNIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM12</i>	HNRSRITITAYQAYAIILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM156</i>	LIRRRITITAYQAYGIIILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM08</i>	QLDVRIITITAYQAYGIIILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM134</i>	IINNVGYITAYSAXRIIILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM37</i>	HRGLDRSHRLYXHMXLVILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
<i>BtAM63</i>	LERQDHSHRLYKHMDEXVILQQPDIKVNAMSSLTNH	35
consensuss.t.yqa.giilQQPDIKVNAMSSLTNH	

Domínio HBL

	<i>NheA</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM06</i>	QKFAKANVREWIDEYDPKLIDLNQEIIMRYSTRFNS	70
<i>BtAM19</i>	QKFAKANVREWIDEYYPKLIDL YQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM18</i>	QKFAKANVREWIDEYDPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM12</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM156</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM08</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM134</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM37</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
<i>BtAM63</i>	QKFAKANVREWIDEYNPKLIDLNQEMMRYSTRFNS	70
consensus	QKFAKANVREWIDEYnPKLIDLNQEMMRYStRFNS	

Domínio HBL

	<i>NheA</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	YYSKLYELAGNVNEDQQAkADLMSAYGKLQLQV	103
<i>BtAM06</i>	YYSKLYELAGNVNQDQqARADLMSASGKLQLLV	103
<i>BtAM19</i>	YYSKLYELAGNVNQDQQAkTDPMSAYGTLQLLV	103
<i>BtAM18</i>	YYSKLYKLAGNVNQDQQAkTDLMSAYGTLQLQV	103
<i>BtAM12</i>	YYSKLYELAGNVN AEDPPAL.....	89
<i>BtAM156</i>	YYSKLYELAGNVNEDQQAkSDfMSAYGKLQLQV	103
<i>BtAM08</i>	YYSKLYKLAGNVNEDQQAkTDFMSAYGKLQLQV	103
<i>BtAM134</i>	YYSKLYELAGNVNEDQQAkTDLMSAYGTLQLQV	103
<i>BtAM37</i>	SYSKLYELAGNINeDEQSkADFTNAYGKLQLQV	103
<i>BtAM63</i>	SYSKLYELAGNINQDEQSkADPYKCIWkTTIAS	103
consensus	YYSKLYELAGNVNeDqQAkT D.msAyGkLQLQv	

Domínio HBL

- X non conserved
- X similar
- X ≥ 50% conserved
- X ≥ 80% conserved