

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da eficácia e caracterização molecular de
Brevibacillus laterosporus no controle biológico de
Ctenocephalides felis felis (Bouché, 1835)
(Siphonaptera: Pulicidae).**

Milene Barbosa Gomes

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Brevibacillus laterosporus NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
Ctenocephalides felis felis (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA:
PULICIDAE).**

MILENE BARBOSA GOMES

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

e co-orientação da Dr^a
Viviane Zahner

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

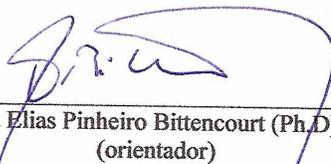
Seropédica, RJ
junho de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

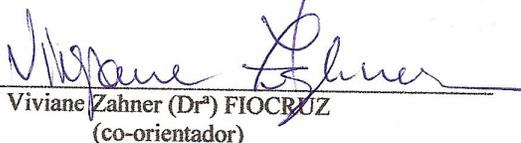
MILENE BARBOSA GOMES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

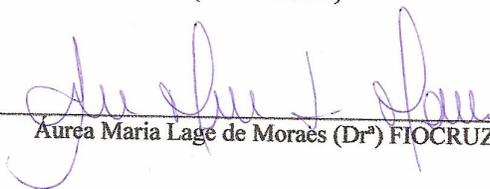
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/06/2011



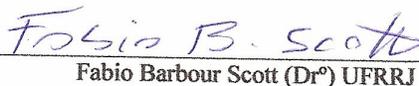
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt (Ph.D) UFRRJ
(orientador)



Viviane Zahner (Dr^a) FIOCRUZ
(co-orientador)



Aurea Maria Lage de Moraes (Dr^a) FIOCRUZ



Fabio Barbour Scott (Dr^o) UFRRJ

Dedico esta vitória primeiramente a Deus, aos meus pais Rodolfo e Maria Cleia. Aos meus irmãos, avó e tios. E ao meu namorado Luis Paulo.

**"O coração do homem
considera o seu caminho, mas o
Senhor lhe dirige os passos."
I saías 16:9**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por guiar meus passos de forma que eu pudesse alcançar mais uma benção em minha vida, a conclusão de mais esta etapa. Sem Ele nada disso seria possível, pois provem Dele toda a sabedoria e a capacidade para adquirir o conhecimento.

Aos meus pais RODOLFO CARLOS e MARIA CLEIA, que com grande esforço e amor puderam, abaixo de Deus, me proporcionar as ferramentas necessárias para a conclusão desta etapa da minha vida.

Ao meu namorado LUIS PAULO, por agüentar as ausências e nervosismo, com carinho, muita paciência e dedicação.

Aos meus familiares por relevarem as ausências em reuniões de família, e por sempre terem uma palavra de ânimo e ajuda no decorrer destes dois anos.

A Dr^a VÂNIA RITA E. P. BITTENCOURT, pela orientação, por me abrir as portas desta Instituição e do seu laboratório, com o maior apressamento e consideração, mostrando-se sempre disponível para dúvidas e dificuldades em todos os momentos, além de ter se tornado uma grande amiga.

A Dr^a VIVIANE ZAHNER, pela oportunidade e confiança, pela lapidação da minha vida profissional sempre com muito carinho, atenção, repreensões e incentivos e também pela amizade, que me faz ter hoje uma grande admiração.

A Dr^a RAQUEL DA SILVA PACHECO, pelo incentivo, confiança e amizade, por permitir a realização deste trabalho no Laboratório de Sistemática Bioquímica sob sua coordenação e a todos os amigos de momentos alegres e de dificuldades que lá deixei.

Ao Dr^o FABIO BARBOUR SCOTT, pela confiança, incentivo e disponibilização do laboratório e material para a realização deste trabalho.

Ao Dr^o IVANO DE FILIPPIS pela disponibilidade na confecção dos líofilos para a realização dos experimentos.

A THAIS RIBEIRO CORREA e VANESSA P. CRUZ VIEIRA, pelo auxílio, norteamento e conselho no desenvolvimento dos testes realizados.

A MARISE PIREZ QUINHONES, pela amizade, carinho, ensinamento, ajuda e socorro, nos momentos mais difíceis e tensos da construção deste trabalho.

Ao amigo WENDELL MARCELO DE SOUZA PERINOTTO, sempre disponível para ajudar em todas as etapas deste trabalho, com carinho, dedicação, atenção e compreensão.

Aos amigos de laboratório LCM, ISABELLE DA COSTA ÂNGELO, PATRÍCIA DA S. GOLO, MARIANA G. CAMARGO, SIMONE B. QUINELATO, ANA PAULA MORAES, FILLIPE SÁ, CAIO JUNIOR BALDUINO por todo companheirismo e auxílio nas experimentações, aprendizagem e vivência do laboratório.

As amigas ISABEL CARRAMASHI, VERÔNICA LEITE e GABRIELA PINHEL, por todo auxílio durante as etapas de execução deste trabalho.

A DAYANA DOS SANTOS PEREIRA, pela contribuição nas técnicas e experimentações realizadas para a conclusão deste trabalho.

A todos os professores do curso de Ciências Veterinárias da UFRRJ e aos colegas de turma pelos conhecimentos trocados nas salas de aulas.

A CAPES pelo auxílio financeiro

BIOGRAFIA

Milene Barbosa Gomes, filha de Rodolfo Carlos Ferreira Gomes e Maria Cleia Barbosa Gomes, nasceu na cidade de Paracambi-RJ, no dia 25 de novembro de 1980.

Cursou e concluiu o ensino fundamental e médio no curso de Formação de Professores (1ª a 4ª série) do Colégio Cenecista Paracambi-CNEC, em dezembro de 1998.

Ingressou na faculdade no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, área de concentração Análises Clínicas, em janeiro de 2000, vindo a concluir o curso em dezembro de 2004 na Universidade Severino Sombra-USS, Vassouras-RJ.

Durante o período da graduação foi estagiária de alguns laboratórios na área de análises clínicas e meio ambiente, este último sendo realizado na Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ com a produção da monografia da graduação. Além disso, participando de congressos e eventos locais.

No ano seguinte após a conclusão do curso de graduação foi selecionada para estagiar no Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-RJ, com a linha de pesquisa em controle biológico, onde permaneceu por cinco anos até a sua entrada para o mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

GOMES, Milene Barbosa. **Avaliação da eficácia e caracterização molecular de *Brevibacillus laterosporus* no controle biológico de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae).** 2011. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Este trabalho avaliou a ação patogênica de estirpes de *Brevibacillus laterosporus* que apresentaram potencial para outros alvos em *Ctenocephalides felis felis*, através de bioensaios com diferentes formulações (induto líquido e liofilizado) nos diferentes estágios de desenvolvimento bacteriano (vegetativo, esporângio e esporo livre) e também buscou-se caracterizar as estirpes por técnicas moleculares como PCR-BREV, RAPD-PCR e analisar seu perfil plasmidial utilizando PFGE e eletroforese convencional que foi determinado pela presença de plasmídeos com tamanhos diferenciados e sua correlação com a patogenicidade. Além disso, a técnica de MLEE foi aplicada e novas isoenzimas foram testadas. Os bioensaios realizados com diferentes formulações demonstraram que houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos com as estirpes NRS1111 e NRS590 apenas nas formulações com induto líquido, contudo não houve diferença entre os estágios de desenvolvimento de *Br. laterosporus*. Através da PCR com o primer BREV foi possível confirmar a posição taxonômica das estirpes analisadas dentro do gênero *Brevibacillus*. Quando aumentamos o número de enzimas testadas pela técnica de MLEE, não foi possível separar estirpes patogênicas de não patogênicas, contudo foi possível observar que *Br. laterosporus* é uma espécie formada por estirpes com baixo polimorfismo genético. Assim, a MLEE se apresenta como ferramenta pouco útil para a caracterização entre as estirpes de *Br. laterosporus*. A técnica de RAPD-PCR foi realizada com os primers OPA11, OPA02 e OPA04, sendo possível observar entre as estirpes um perfil altamente polimórfico e discriminatório. A identificação de estirpes descritas como *Br. agri*, foram caracterizadas como *Br. laterosporus*, utilizando as técnicas de MLEE e RAPD-PCR. Por diferentes técnicas de eletroforese (PFGE e Unidirecional) foi possível obter um perfil plasmidial de cada estirpe utilizada neste trabalho, contudo podemos afirmar que a patogenicidade em *Br. laterosporus* não está relacionada com a presença de plasmídeos.

Palavras-chave: *Brevibacillus laterosporus*, Perfil Plasmidial, *Ctenocephalides felis felis*, Controle Biológico, PFGE

ABSTRACT

GOMES, Milene Barbosa. **Evaluation of the effectiveness and molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* in biological control of *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae).** 2011. 112f. Dissertation (Master Science in Veterinary Parasitology, Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

The current study evaluated, by bioassay, the action of pathogenic strains of *Brevibacillus laterosporus* that showed potential to other targets in *C. felis felis*. Also, this study analyzed the plasmid profile using molecular techniques: PFGE and conventional electrophoresis. These analyses determined the presence of plasmids with different sizes, and the profiles were correlated with the pathogenicity of *Br. laterosporus* strains. In addition, MLEE was applied and new isoenzymes were tested. Bioassays showed significant differences between the control and the groups treated with strains NRS1111 and NRS590, but no difference was observed among the developmental stages of *Br. laterosporus*. When the number of enzymes tested by MLEE was increased, the pathogenic strains were not separated from non-pathogenic strains; the results showed, however, that *Br. laterosporus* is a species formed by strains with low genetic polymorphism. In conclusion, MLEE is presented as a useful tool for characterization of strains *Br. laterosporus*. The RAPD-PCR technique was performed with primers OPA11, OPA02 and OPA04, and a high polymorphic profile was observed among the strains. The identification of strains described as *Br. agri* were designated as *Br. Laterosporus* by MLEE and RAPD-PCR. Using electrophoresis techniques (PFGE and Unidirectional), a plasmid profile was obtained for each strain investigated in the current study; and, therefore, this study may conclude that the pathogenicity of *Br. laterosporus* is not related to the presence of plasmids.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus*, Plasmid Profile, *Ctenocephalides felis felis*, Biological Control, PFGE

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes do gênero <i>Brevibacillus</i> e do gênero <i>Bacillus</i> empregadas neste trabalho e a descrição de sua procedência.....	25
Tabela 2. Enzimas testadas na análise isoenzimática das amostras do gênero <i>Brevibacillus</i>	36
Tabela 3. Sistema de revelação e tampão utilizado para as enzimas que obtiveram no teste, bom resultado para a análise isoenzimática das estirpes do gênero <i>Brevibacillus</i> ..	37
Tabela 4. Número de adultos emergidos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> após 25 dias do tratamento com 100ul do induto de crescimento das cepas NRS 1111, NRS 590 e NI 176 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.....	45
Tabela 5. Número de adultos emergidos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> após 25 dias do tratamento com 5ul do induto de crescimento das cepas NRS 1111, NRS 590 e NI 176 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.....	47
Tabela 6. Números de adultos emergidos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> após 25 dias do tratamento com as cepas NRS 1111, NRS 590 e NI 176 liofilizadas nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.....	49
Tabela 7. Números de adultos emergidos de <i>Ctenocephalides felis felis</i> após 35 dias do tratamento com 50ul do induto de crescimento bacteriano concentrado das cepas NRS 1111 e NRS 590 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.....	51
Tabela 8. Perfil dos eletromorfos encontrados nas análises dos oito “locus” isoenzimáticos das estirpes do gênero <i>Brevibacillus</i> e seu grupamento dentro de 24 “zymovares”.....	57
Tabela 9 Perfil plasmidial encontrado nas estirpes do gênero <i>Brevibacillus</i> e <i>Bacillus</i> , através das diferentes técnicas de PFGE e Miniprep com corrida eletroforética unidirecional, para visualização dos números de bandas e pesos moleculares em Kilobases.....	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tubos de ensaio contendo 0,5 g da dieta para *Ctenocephalides felis felis* vedados com tecido de náilon (TNT) e elásticos..... 31
- Figura 2.** Caixas de isopor contendo os tubos de ensaio com 0,5 g da dieta selecionada, devidamente vedados com tecidos de náilon (TNT) e elásticos..... 32
- Figura 3.** Crescimento microbiano a partir da amostra original das estirpes NRS 1111 e NRS590 de *Br laterosporus* retiradas do estoque e plaqueada por estriamento em Àgar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN) com 3mg de Polimixina B, após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C..... 53
- Figura 4.** Crescimento microbiano a partir de 4 larvas (1,2,3,4) retiradas do grupo controle 1 (com veículo) e 2 (sem veículo) em placas de Petri contendo meio Àgar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN) com 3mg de Polimixina B após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C. Este reisolamento ocorreu após o trigésimo quinto dia de experimentação do bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado..... 53
- Figura 5.** Crescimento microbiano a partir de quatro larvas (1,2,3,4) retiradas dos grupos tratados com as estirpes NRS1111 (112) e NRS590 (136) nos diferentes estágios de esporângio (ESPO) e esporo livre (ESPL) em placas de Petri contendo meio Àgar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN) com 3mg de Polimixina B após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C. Este reisolamento ocorreu após o trigésimo quinto dia de experimentação do bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado..... 54
- Figura 6.** Crescimento microbiano, por estriamento, que partiu de uma alçada coletada de cada colônia presente nos crescimentos a partir das larvas (L1, L2, L3 e L4) retiradas dos grupos tratados com as estirpes NRS1111 (112) e NRS590 (136) nos diferentes estágios de esporângio (ESPO) e esporo livre (ESPL) em placas de Petri contendo meio Àgar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN), após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C. Este reisolamento ocorreu após o trigésimo quinto dia de experimentação do bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado..... 54
- Figura 7.** Análise fenética utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de isoenzimas por MLEE, em três diferentes clusters (A, B, C)..... 59

LISTA DE FIGURAS (CONTINUAÇÃO)

Figura 8. Produtos das amplificações com primer BREV (BREV174F/1377R) específico para o gênero *Brevibacillus*, em gel de agarose ultra pura 1,2%, TBE 1X. M: marcador molecular 1Kb ladder invitrogen; 1: controle negativo; 2: controle positivo (LFB052) 3 a 32: estirpes de *Br laterosporus*; 33: *Br brevis* (clínico); 34 a 37: *Br agri*; 38: *Br parabrevis*; 39: *Br laterosporus*; 40: *Bacillus thuringiensis*; 41: *Bacillus cereus*..... 63

Figura 9. Perfis gerados por RAPD-PCR com o primer OPA 11 mostrando a variabilidade genética nas estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades, em gel de agarose ultra pura 1,5%, TBE 1X. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III; 1: controle negativo; 2 a 29: estirpes de *Br laterosporus*; 30: *Br brevis* (clínico); 31 a 34: *Br agri*; 35: *Br parabrevis*; 36: *Br laterosporus*; 37: *Br brevis*; 38: *Bacillus thuringiensis*; 39: *Bacillus cereus*..... 66

Figura 10. Perfis gerados por RAPD-PCR com o primer OPA 02 mostrando a variabilidade genética nas estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades e como controle estirpes do gênero *Bacillus*, em gel de agarose ultra pura 1,5%, TBE 1X. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III; 1: Controle Negativo; 2 a 29: estirpes de *Br laterosporus*; 30: *Br brevis* (amostra clínica); 31 a 34: *Br agri*; 35: *Br parabrevis*; 36: *Br laterosporus*; 37: *Br brevis*; 38: *Bacillus thuringiensis*; 39: *Bacillus cereus*; ϕ : sem amostra..... 67

Figura 11. Perfis gerados por RAPD-PCR com o primer OPA 04 mostrando a variabilidade genética nas estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades e como controle estirpes do gênero *Bacillus*, em gel de agarose ultra pura 1,5%, TBE 1X. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III invitrogen; 1: Controle Negativo; 2 a 29: estirpes de *Br laterosporus*; 30: *Br brevis* (amostra clínica); 31 a 34: *Br agri*; 35: *Br parabrevis*; 36: *Br laterosporus*; 37: *Br brevis*; 38: *Bacillus thuringiensis*; 39: *Bacillus cereus*..... 68

Figura 12. DNA plasmidial extraído da estirpe de *Br laterosporus* (Shi 1) por Kits comerciais em gel de agarose ultra-pura 0,5%, TBE 1X, por 3 horas a 80V. M: marcador molecular λ DNA EcoRI/Hind III invitrogen; 1: Invitrogen; 2: Macherey Nagel; 3: Fermentas; 4: Roche; 5: Invitrogen diluído 1:10; 6: ϕ sem amostra..... 70

Figura 13. Plasmídeos extraídos por miniprep das estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades, em gel de agarose ultra pura 0,7%, TBE 1X, por 4 horas a 60V. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III invitrogen; 1: ATCC6457; 2: NRS1338; 3: NRS1647; 4: Shi1; 5: Ad681; 6: NRS1648; 7: Ad647; 8: NRS1267; 9: Shi5; 10: Bon706; 11: NRS590; 12: ATCC9141; 13: NRS1247; 14: BII6-92; 15: NRS1111; 16: NRS1643; 17: Ad541; 18: Ad439; 19: Bon712; 20: CCEB342; 21: NRS1883; 22: Ad682; 23: Bon707; 24: Shi3; 25: Shi2; 26: NRS1645; 27: Shi4; 28: NRS340; 29: NRS1646; 30: ATCC9141; 31: Bon712; 32: NRS1264; 33: ATCC64; 34: LFB052; 35: NRS1642; 36: NRS661..... 72

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACON	Aconitase
ADH	Alanina desidrogenase
ANOVA	Análise de Variância
BHI	Brain Heart Infusion
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BOX-PCR	Região genômica com sequências repetitivas e conservadas (região BOX)
BREV	Gênero <i>Brevibacillus</i>
°C	Grau Celsius
CCC	Coefficiente de Correlação Cofenética
CCGB	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos
CO ₂	Dióxido de Carbono
Cry	Crystal proteins
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DICE	Dice coefficient
DNA	Ácido dexossirribonucleico
dNTP	Dexossirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGTA	Acido Etileno-Glicol Tetra-Acético
ESPL	Esporo livre
ESPO	Esporângio
EUA	Estados Unidos da América
FUM	Fumarase
g	grama
GC	Guanidina-Citosina
GD2	Glutamato desidrogenase
GPI	Fosfoglicose isomerase
Hae III	<i>Haemophilus aegypticus</i>
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i>
IDH	Isocitrato desidrogenase
ITS-PCR	Intergenic Transcribed Sequences- Polymerase Chain Reaction
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
LDH	Leucina desidrogenase
M	Molar
MDa	MegaDalton
MDH	Malato desidrogenase
ME	Enzima Máfica
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
MIP	Manejo Integrado de Pragas
ml	Mililitro

LISTA DE ABREVIACOES (CONTINUAÇAO)

MLEE	Multi-locus Enzyme Electrophoresis
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MPI	Manose-6-fosfato isomerase
MTT	Cloreto de Tetrazólio
Mtx	Mosquitocidal toxin
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato
NaH ₂ PO ₄	Fosfato Monobásico de Sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Dibásico
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	nanograma
NTSYS	Numerical Taxonomy System
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	Operon Technologies, Alameda, CA, USA
pb	Pair of base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
Pmol	Picomol
PMS	N-Methylphenazonium Methosulfate
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
ppm	Partes por milhão
RAPD	Randon Amplified Polymorphic DNA
RCI's	Reguladores de Crescimento dos Insetos
RNA	cido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SJ	Jaccard Similarity Coefficient
SSM	Simple Matching Similarity Coefficient
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris/cido Bórico/EDTA
TE	Tris/EDTA
TNT	Tecido não Tecido
Torr	John Torrey - unidade de medida da pressão atmosférica
Tris	Hidroximetil Aminometano
Tris-HCl	Tris Hidrocloro
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colônia/mililitro
l	Microlitro
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
U.R.	Umidade Relativa do Ar
UV	Ultravioleta
M	Micromolar
v	Volts
VEG	Vegetativo
v/v	Volume por Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Controle de Vetores e Pragas-Agrícolas.....	4
2.2 Controle Microbiano.....	5
2.3 Gênero <i>Brevibacillus</i>	10
2.4 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	10
2.5 <i>Ctenocephalides felis felis</i>	12
2.5.1 Distribuição geográfica.....	12
2.5.2 Biologia.....	12
2.5.3 Importância médico-veterinária.....	14
2.5.4 Controle Químico e Resistência.....	16
2.6 Marcador Molecular.....	18
2.6.1 Eletroforese de isoenzimas (MLEE-Multilocus Enzyme Electrophoresis).....	18
2.6.1.2 Taxonomia numérica.....	19
2.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
2.6.3 RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction).....	21
2.7 Perfil Plasmidial.....	22
2.8 Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE- Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	23
3 MATERIAS E MÉTODOS	25
3.1 Estirpes Bacterianas.....	25
3.2 Manutenção e Cultivo Bacteriano.....	26
3.3 Obtenção das Bactérias liofilizadas.....	27
3.4 Contagem Total de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml).....	28
3.5 Manutenção da Colônia de Pulga <i>Ctenocephalides felis felis</i>	29
3.6 Bioensaios.....	29
3.7 Bioensaio com <i>Ctenocephalides felis felis</i>	30
3.7.1 Bioensaio com 100ul do induto bacteriano.....	31
3.7.2 Bioensaio com 5ul do induto bacteriano.....	31

3.7.3 Bioensaio com amostras liofilizadas.....	32
3.7.4 Bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado.....	32
3.7.5 Cálculo da Eficácia.....	33
3.8 Reisolamento de <i>Brevibacillus laterosporus</i> após o Bioensaio com 50ul do Induto Bacteriano Concentrado.....	33
3.9 Análise Estatística.....	34
3.10 Análise Isoenzimática.....	34
3.10.1 Crescimento e lise celular.....	34
3.10.2 Eletroforese de isoenzimas.....	34
3.10.3 Revelação das isoenzimas.....	35
3.10.4 Tabulação dos dados e análise numérica.....	38
3.11 Caracterização do Perfil Plasmidial dos Isolados.....	38
3.11.1 Extração do DNA plasmidial manual e por “Kits”.....	38
3.11.2 Eletroforese convencional.....	39
3.11.3 Extração do DNA plasmidial a partir de “plugs” de agarose.....	40
3.11.4 Corrida eletroforética em PFGE.....	40
3.12 Técnica de RAPD-PCR.....	41
3.12.1 Isolamento, purificação e quantificação do DNA.....	41
3.12.2 Amplificação do DNA por PCR- RAPD.....	42
3.12.3 Amplificação do DNA por PCR-BREV.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Bioensaio com Induto Bacteriano na Formulação Líquida.....	44
4.1.1 Bioensaio com 100ul do induto bacteriano.....	44
4.2.2 Bioensaio com 5ul do induto bacteriano.....	46
4.3 Bioensaio com Estirpes Bacterianas Liofilizadas.....	48
4.4 Bioensaio com 50ul do Induto Bacteriano Concentrado.....	50
4.5 Reisolamento Bacteriano.....	52
4.6 Tipagem Molecular.....	55

4.6.1 Análise isoenzimática.....	55
4.6.2 Reação em cadeia da polimerase - PCR-BREV.....	62
4.6.3 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD-PCR.....	64
4.7 Análise Plasmidial.....	69
4.7.1 Kits de extração.....	69
4.7.2 Minipreparação.....	70
4.7.3 Plasmídios por PFGE.....	73
5 DISCUSSÃO	75
5.1 Bioensaios.....	75
5.2 Tipagem Molecular.....	78
6 CONCLUSÃO	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

Alguns dos principais problemas enfrentados pelos países desenvolvidos e em desenvolvimento é conciliar o crescimento populacional com a demanda de alimentos e ocupação desordenada, combinada com a invasão e desmatamento de áreas verdes. O avanço tecnológico no sistema produtivo agrícola e a proteção destas áreas tentam compensar este processo, porém, torna-se necessária a reestruturação e desenvolvimento de tecnologias que visem um melhor aproveitamento dos recursos naturais com intuito de fortalecer a cadeia produtiva e minimizar os efeitos deletérios ao meio ambiente e ao homem. Entretanto, independente do “status” quantitativo na produção de alimentos, o aspecto qualitativo está sendo cada vez mais questionado, devido a maior conscientização do mercado em adquirir alimentos mais saudáveis e livres de resíduos de agrotóxicos. Assim sendo, a principal tecnologia adotada para o controle das pragas, que é a utilização de agrotóxicos, deverá ser reavaliada para evitar os prejuízos causados ao ambiente e o homem. Pesquisadores buscam aprimorar ou descobrir novas tecnologias de manejo, engajados em desenvolver táticas de controle eficientes e de encontro com a tendência mundial de produzir alimentos livres de resíduos de agrotóxicos.

De acordo com Rust (2005) e Melo et al. (2007), o controle das pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis*, transmissora de diversos patógenos e causadora de irritações na pele de cães e gatos, ainda é realizado apenas por produtos químicos (inseticidas), que utilizados de forma desordenada e com a rápida adaptação das pulgas aos princípios ativos, tem apresentado um perfil de resistência. Portanto é necessário reduzir o uso destes produtos e controlar as infestações ocasionadas por este vetor de forma mais segura.

O fator que tem gerado preocupação aos pesquisadores, profissionais e criadores, é o resíduo e a resistência produzida por estes produtos químicos quando não administrados corretamente. Portanto, torna-se importante à busca de alternativas capazes de minimizarem estes efeitos já detectados no controle de pragas e vetores.

O manejo integrado de pragas é uma importante ferramenta de controle e composta por inúmeras táticas que podem ser utilizadas isoladamente, ou em conjunto, no controle dos problemas sanitários, destacando-se o controle biológico como um dos principais pilares. Logo, o uso de inimigos naturais com outras diversas formas de manejo é uma maneira de aprimorar à sua utilização no manejo integrado de pragas, como é o caso da utilização de inseticidas seletivos. Dentre os agentes de controle utilizados no manejo de insetos, podemos citar a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) que vem sendo utilizada há mais de cinquenta anos no controle de insetos (MEDEIROS et al., 2005). É uma bactéria de solo, formadora de esporos, que cresce em aerobiose e é facultativamente anaeróbica, reage positivamente para a coloração de Gram e pode ser encontrada nos mais variados ecossistemas (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2008). A descoberta dos plasmídios desta bactéria contendo os genes Cry que codificam as entomotoxinas aumentou ainda mais o interesse em sua caracterização. Porém, segundo Rao et al. (1995), Sanchis et al. (1999) e Charles e Nielsen-Leroux (2000) foi observada alguma resistência dos insetos alvos e problemáticas como: baixa persistência no ambiente, alvos restritos, não reciclagem em cadáveres de larvas além de as toxinas serem facilmente inativadas pela luz ultravioleta ou temperaturas extremamente altas quando aplicadas “in vivo”.

Portanto, é importante à busca de novas estirpes que superem as deficiências apresentadas por aquelas já conhecidas, assim como sua identificação e caracterização molecular a fim de explorar a diversidade fenética e filogenética dos microrganismos da natureza com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas dos mesmos.

Shida et al. (1996) descreveu *Brevibacillus laterosporus* como isolada originalmente de água, sendo uma bactéria aeróbia, esporulada, Gram-positiva, dotada de corpo para-esporal aderido ao esporo. De acordo com Favret e Yousten (1985), estirpes isoladas a partir de larvas mortas de abelhas apresentam potencial patogênico para *Lasioderma serricorne*, sendo então uma possível opção de inseticida microbiano. Atualmente foram testadas e patenteadas para uso no controle biológico de *Musca domestica* (RUIU et al., 2006, 2007 e 2008). Os bioensaios em *Br. laterosporus* tem demonstrado uma heterogeneidade em relação a atividade biocida das estirpes. Portanto, buscou-se encontrar marcadores moleculares que identificassem as estirpes patogênicas como descrito por Singer (1996), onde estirpes mosquitocidas foram distinguidas daquelas não mosquitocidas pela técnica de Eletroforese de multilocus enzimático (MLEE). Foram utilizadas diferentes ferramentas, tais como: BOX-PCR, ITS-PCR e hibridização por sonda 16S rRNA. Entretanto estas não foram capazes de diferenciar estirpes quanto seu potencial patogênico (OLIVEIRA et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho é avaliar a ação de algumas estirpes de *Br. laterosporus* em *C. felis felis* e buscar marcadores moleculares que distingam estirpes com atividade biocida. Para isto utilizaremos MLEE a fim de corroborar ou não os achados de Singer (1996) em relação a forma de ação de grupos diferenciados quanto ao espectro de ação e detectar a presença de plasmídios por eletroforese convencional e eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) para correlacionar com o potencial de patogenicidade encontrado em nossas estirpes testadas e aquelas já avaliadas descritas por Oliveira et al. (2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle de Vetores e Pragas-Agrícolas

Embora atualmente diversos produtos a base de variados microrganismos já existam no mercado mundial, o uso indiscriminado de uma enorme quantidade de inseticida químico o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) que possui ação residual, com custo barato e extremamente tóxico para a grande maioria dos insetos ainda existe. Sua inserção neste mercado ocorreu com o Programa de controle da Malária, que se baseava na erradicação do vetor *Anopheles gambiae* (REGIS et al., 2000). Esse controle resultou na redução drástica da incidência da malária em todo o mundo, mas promoveu um problema sem precedentes que foi a recuperação dos vetores com resistência a esse produto e a morte de populações de mosquitos competidores, predadores e patógenos (RUIU et al., 2007). Os organoclorados não apresentam modo de ação claramente estabelecido, porém sabe-se que eles atuam no canal de sódio, provavelmente mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios, impedindo, assim, a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos (BRAGA et al., 2007). Além disso, se depositam nos tecidos adiposos, sendo altamente cumulativos, podendo então atingir qualquer organismo vivo ao redor do local de aplicação. Seu efeito é inversamente proporcional à temperatura: quanto mais baixa a temperatura, mais tóxico é o DDT para os insetos (O'REILLY et al., 2006). Embora tenham sido largamente adotados pelos programas de controle de malária, tiveram seu uso descontinuado e chegaram, inclusive, a ser proibidos em vários países devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos do organismo de animais e de humanos (WALISZEWSKI et al., 2003; CHEN et al., 2005). Trabalhos relacionados ao DDT relatam a presença de substância no leite materno e sua associação com a ocorrência de câncer em humanos (BOUWMAN et al., 1990; WOLFF et al., 1993). A ocorrência destes fatores promoveu a necessidade urgente de ferramentas alternativas para combater a população resistente de vetores sem atingir ou agredir populações de insetos, o homem e o meio ambiente.

Apesar de ter sido relatada desde o século III A.C. a patologia dos insetos foi efetivamente comprovada com a classificação de um entomopatógeno por Réaumur em 1726, quando ele identificou um fungo do gênero *Cordyceps* atacando um lepidóptero (ALVES, 1998). Segundo Alves (1998) diversos pesquisadores comprovaram a presença de microrganismos causando doenças ou até morte nos insetos. Porém só nos últimos vinte anos a patologia dos insetos ganhou o devido destaque, por ter como um de seus objetivos principais o controle biológico de insetos-pragas e vetores. O controle biológico é definido como o método que consiste no controle de pragas por meio de inimigos naturais, que são os organismos que mantêm os níveis de população dessas pragas em equilíbrio. Como exemplos de organismos denominados inimigos naturais que possuem maior potencial para o controle biológico de pragas são: os fungos, bactérias, vírus, alguns predadores e insetos parasitóides, por ser possível multiplicá-los em maior escala em laboratórios e ser fácil aplicá-los ou liberá-los no campo (GALLO et al., 2002). Pode se entender como predadores, os organismos benéficos, inimigos naturais, que geralmente consomem mais de uma presa para completar seu desenvolvimento, podendo atacar uma grande variedade de insetos-praga. O predador pode mudar sua preferência alimentar de acordo com a abundância populacional da praga (VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996; GALLO et al., 2002). São exemplos: aranhas, peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e insetos predadores como *Cycloneda sanguinea*, *Nabis sp.*, *Calosoma granulatum*, etc. Já os parasitoides são insetos que necessitam, na maioria das

vezes, de apenas um indivíduo do hospedeiro para completar o seu desenvolvimento. Eles matam seu hospedeiro. Geralmente são mais específicos que os predadores (VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996; GALLO et al., 2002). São exemplos: *Cotesia flavipes*, *Trissolcus basalis*, *Neodusmetia sangwanis*, *Trichogramma pretiosum*, etc. Os patógenos são microorganismos causadores de doenças em insetos; neles se desenvolvem com certa rapidez, terminando por causar a morte da praga. Alguns patógenos são facultativos e outros são obrigatórios. Os facultativos se desenvolvem tanto no inseto-hospedeiro como em meio de cultura artificial. São exemplos: fungos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, bactéria como *Bacillus thuringiensis*, etc. Os obrigatórios, por sua vez, só se desenvolvem no inseto-hospedeiro, como o *Baculovirus anticarsia* e o *B. erinnyis* (ALVES, 1998).

O controle biológico deve ser considerado como um componente de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) estes componentes incluem: vigilância, redução da fonte (ou manejo ambiental), controle biológico, controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas (GALLO et al., 2002).

2.2 Controle Microbiano

O controle microbiano é considerado um ramo do controle biológico, que visa a utilização dos patógenos para a manutenção da população de pragas e vetores. A existência de no mínimo um entomopatógeno para cada inseto na natureza permite ao homem explorar o potencial em cada associação (ALVES, 1998). Sua aplicação apresenta vantagens como: seletividade aos inimigos naturais, capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente, efeitos secundários sobre insetos, fácil aplicação. Algumas limitações também são consideradas importantes: reduzido espectro de ação, reação mais lenta que os inseticidas químicos, condições favoráveis para atuar e cuidados no armazenamento (POLANCZYK et al., 2006).

Segundo Polanczyk et al. (2006) os fungos entomopatogênicos foram os primeiros agentes a serem utilizados no controle microbiológico. Ainda segundo o mesmo autor, aproximadamente 80% das doenças tem como agentes etiológicos os fungos. Estes agentes de controle, em sua maioria apresentam grande variabilidade genética em seus isolados, principalmente quanto a patogenicidade e caracteres moleculares, podendo determinar o grau de virulência do patógeno, interferindo, desta forma, os percentuais de eficiência no controle dos insetos (BARCI et al., 2009). Muitos fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* infectam a cutícula dos hospedeiros via conídios, que se aderem e germinam formando uma série de estruturas durante a penetração (WANG; ST. LEGER, 2005). Esta espécie fúngica produz uma variedade de enzimas degradantes de cutícula durante a penetração no hospedeiro (ST. LEGER et al., 1991). *M. anisopliae* infecta uma variedade de insetos, através da penetração direta na cutícula do hospedeiro. A penetração fúngica no tegumento do inseto alvo seguido de colonização, infecção generalizada e posterior morte do inseto geralmente ocorrem entre três a dez dias após contato. Este processo, porém, é dependente de fatores limitantes como componentes nutricionais da cutícula, reações químicas e ação de micotoxinas e da radiação ultravioleta (CHANDLER et al., 2000). No Brasil os fungos *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* são principais agentes de controle do besouro *Anisoplia austriaca* e bicho-da-seda *Bombyx mori* respectivamente (ALVES, 1998).

Como Bittencourt (2000) e Melo et al. (2007), atualmente os trabalhos tem descoberto a potencialidade da utilização dos fungos citados acima no controle de carrapatos e pulgas vetores. Por exemplo o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que segundo Howell et al. (2007) é capaz de transmitir o protozoário *Babesia bovis*, agente etiológico da Babesiose bovina. Em seu trabalho Leemon et al. (2008) descreve que muitos estudos têm provado a alta

eficácia do fungo *M. anisopliae* “*in vitro*” contra o carrapato *R. (Boophilus) microplus*, porém poucos conseguem demonstrar eficácia aceitável quando são aplicados no gado “*in vivo*”. Já com *Amblyomma cajennense* transmissor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa, Lopes et al. (2007) descreve que o fungo *M. anisopliae* em formulações oleosas mostrou um melhor resultado que *B. bassiana* no controle deste carrapato. Em *C. felis felis*, transmissora da bactéria *Bartonella sp* e ou *Rickettsia* (LAPPIN; HAWLEY, 2009), estes mesmo fungos podem colonizar sua cutícula e produzir infecção generalizada podendo também causar a morte (MELO et al., 2007).

Em relação a utilização dos vírus, como por exemplo *Baculovirus* ou Vírus de Poliedrose Nuclear que são os mais estudados para aplicação no controle, a multiplicação apenas no hospedeiro vivo e a possibilidade de causar infecção crônica limitam seu uso e o desenvolvimento de um bioinseticida (MOSCARDI, 1998; POLANCZYK et al., 2006). No Brasil os estudos se concentram no controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), sua penetração se dá por via oral e são posteriormente dissolvidos no meio alcalino do intestino, liberando, em seguida, os vírions. As proteínas presentes nos poliedros de vírus são responsáveis pela destruição da membrana peritócica e da paralização da produção da mesma no inseto alvo (ALVES, 1998; SAVIO et al., 2008). Ainda segundo Savio et al. (2008) o controle biológico feito pelo *B. anticarsia* em estágios definidos da lagarta é extremamente eficiente no controle desta praga.

Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos, são poucas aquelas que possuem características que permitem seu uso no controle microbiano de insetos e vetores praga (ALVES, 1998; SILVA et al., 2002). Dentre elas podemos destacar *B. thuringiensis* descoberto em 1911 por Berliner, isolado de *Anagasta kuehniella* e *B. sphaericus* isolado em 1964 por Neide em larvas de *Culiseta incidens*. A descrição destas estirpes mosquitocidas permitiu maiores estudos do controle microbiológico com bactérias entomopatogênicas para insetos, trazendo inúmeras contribuições para o conhecimento de caracteres biológicos, químicos, físicos e genéticos do Gênero *Bacillus* e Gêneros correlatos que abrigam atualmente a maior parte das espécies em estudo (ALVES, 1998; REGIS et al., 2000). Tais gêneros são ainda bastante estudados, por apresentarem características esporulantes, que permitem maior persistência no meio ambiente, além de seguros para o homem e mais práticos para aplicação no controle de vetores a pragas agrícolas (YAMAMOTO; DEA, 2000). Como citado anteriormente dentre as bactérias com potencial para o controle biológico as mais conhecidas e utilizadas no mercado atual são *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*, pois desempenham um papel importante no controle de larvas de Culicídeos, Flebotomíneos, Triatomíneos e Simulídeos destes grupos fazem parte os maiores transmissores de doenças de países tropicais, como o Brasil (APAYDIN et al., 2005). *B. sphaericus* é uma bactéria estritamente aeróbica, formadora de esporos circulares de localização terminal ou subterminal. Sua atividade patogênica esta relacionada a dois tipos de toxinas: do cristal e Mtx. A primeira está ligada ao cristal produzido durante a esporulação e é comum as estirpes com alta atividade entomocida. Já a toxina Mtx produzida durante o estágio de crescimento vegetativo está dispersa no citoplasma ou localizada em algum sitio da célula e está relacionada as estirpes com baixa ou nenhuma atividade entomocida. Litaiff et al. (2008) descreve que a atividade patogênica desta bactéria, provoca um colapso nos sistemas nervoso e muscular, resultando na perda da capacidade de flutuar da larva, e, conseqüentemente, a asfixia por afogamento se torna a principal causa de morte. Oliveira; Tadei (2005) e Oliveira et al. (2005) descreveram a paralisia do corpo como a perturbação inicial do comportamento das larvas de *A. albitarsis*, *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*, depois de serem tratados por 30 minutos, com diferentes concentrações de *B. sphaericus* cepa 2362 e S1116. Alterações na morfologia interna e externa foram observados após 15 minutos, com evidente desorganização estrutural do epitélio intestinal, mostrando a maioria das células

inchadas. Algumas vantagens relevantes no uso desta bactéria para o controle de vetores está na prolongada atividade residual das toxinas no ambiente, especialmente em populações de água com elevada poluição orgânica e reciclagem do microrganismo no ambiente, por multiplicação em larvas de mosquito morto durante vários meses (SILVA et al., 1998).

B. thuringiensis é um bastonete Gram-positivo, da família *Bacillaceae*, que durante a esporulação produz inclusões protéicas cristalinas (SILVA et al., 2002). Estas inclusões denominadas cristais, são produzidas sob a forma de protoxina e serão transformadas no intestino da larva do inseto em peptídeos tóxicos, pela ação do pH alcalino intestinal e proteases, para ser reconhecida por receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio, onde poderão formar poros que culminarão no desequilíbrio iônico, levando a lise das células epiteliais e a morte (REGIS et al., 2000; POLANCZYK; ALVES, 2003; BRAGA et al., 2007). Diversos autores concordam que *B. thuringiensis* apresenta uma patogenicidade seletiva, que corresponde a ocorrência de evolução e adaptação destes patógenos dentro de seus hospedeiros naturais, por isso existem diferenças de variedades e níveis de toxicidade, além de poderem ser encontrados em variados ambientes, tais como solo, cadáveres de insetos, ambientes aquáticos, entre outros (APAYDIN et al., 2005). A patogenicidade e a especificidade de uma dada linhagem de *B. thuringiensis* são determinadas pelos tipos de genes “cry” funcionais que a mesma possui, ou seja, a atividade inseticida para determinado alvo varia de acordo com a classe de genes presentes na bactéria, que segundo Polanczyk e Alves (2003) estão presentes em uma variedade de plasmídios. Na espécie *B. thuringiensis* var. *israelensis* tóxico para dípteros, a ação patogênica é resultante de quatro genes principais (“cry4Aa”, “cry4Ba”, “cry11Aa” e “cyt1Aa”), todos localizados em um único plasmídeo de 72MDa (ZAHNER, 1992; CRICKMORE et al., 1998). É importante salientar que as toxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* agem sinergicamente, ou seja, quando isoladas têm seu efeito reduzido. Este número de toxinas reduz a probabilidade do desenvolvimento da resistência (POLANCZYK; ALVES, 2003; BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007). Contudo, o uso comercial destas espécies na agricultura, já demonstrou efeitos adversos como: baixa persistência no ambiente, alvos restritos, não reciclagem em cadáveres de larvas e as toxinas são facilmente inativadas pela luz ultravioleta ou temperaturas extremamente altas (SANCHIS et al., 1999).

De acordo com Massochin e Fiuza (2008) cultivares transgênicos (planta-Bt) ocupam hoje o segundo lugar no ranking de utilização de plantas geneticamente modificadas devido a cerca de 19 milhões de hectares plantados nas últimas décadas. A inserção de genes em plantas foi relatada por Ibargutxi et al. (2006), como preocupante, devido ao potencial desenvolvimento de resistência pelo inseto alvo. Em seus experimentos diferentes populações geográficas de *Earias insulana* (Lepidoptera), pragas de plantações de algodão transgênico, apresentaram diferentes níveis de susceptibilidade para proteína “Cry” individuais. Vários mecanismos de resistência foram descritos por Alves (1998), dentre eles podemos citar o não acoplamento da toxina, que pode ocorrer devido a mudanças na conformação do receptor de membrana no inseto alvo, decréscimo na solubilização da toxina ou redução da sensibilidade.

Alguns trabalhos já relatam na literatura a resistência no campo de populações de mosquitos a essas bactérias (RAO et al, 1995; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000; IBARGUTXI et al., 2006).

O contorno técnico encontrado para esta problemática é a busca na natureza de outras opções de bactérias, que possam ser eventualmente utilizadas no controle microbiológico de pragas e insetos vetores de doenças. De acordo com Shida et al. (1996) o gênero *Brevibacillus* apresenta espécies que são uma possível alternativa para o controle microbiano, uma vez que apresenta amplo espectro de ação e vem demonstrando em diferentes trabalhos o seu potencial biotecnológico como: produção de antibióticos, de proteínas e probióticos além de controle de

insetos e moluscos vetores (LOGAN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; PARVEZ et al., 2009; WANG et al., 2010; SAIKIA et al., 2011).

2.3 Gênero *Brevibacillus*

Segundo Choi et al. (2010) o gênero *Brevibacillus* é composto atualmente por 16 espécies dentre elas: *Brevibacillus thermoruber*, *Brevibacillus choshinensis*, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus reuszeri*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus limnophilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Brevibacillus invocatus*, *Brevibacillus formosus*, *Brevibacillus fluminis*, *Brevibacillus centrosporus*, *Brevibacillus bortelensis*, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus ginsengisoli*, *Brevibacillus panacihumi*, *Brevibacillus levickii*. Este grupo é formado por bactérias Gram-positivas, aeróbias estritas, mesofílicas com esporo oval. De acordo com Ruiu et al. (2006) podem ser encontradas em diferentes ambientes tais como: água, solo e algumas espécies em cadáveres de insetos.

2.4 *Brevibacillus laterosporus*

Bactéria Gram-positiva, aeróbia estrita, mesofílica, além de formadora de esporo oval com deformação do esporângio (SHIDA et al., 1996). Diferencia-se dos demais bacilos esporulados por apresentar, segundo Laubach (1916), esporo lateral e corpos para-esporais basofílicos, que se ligam ao esporo, fazendo com que este tenha o aspecto “de canoa” o que facilita sua identificação ao nível morfológico (FAVRET; YOUSTEN, 1985). Questiona-se se estes corpos basofílicos poderiam proporcionar vantagens ecológicas ainda não definidas, um valor adaptativo caso fossem usadas na formação do esporo dormente ou outra possível função que seria a ação antimicrobiana ou mesmo entomocida (MONTALDI; ROTH, 1990; RUIU et al., 2007). *Br. laterosporus* tem despertado atenção devido ao seu grande potencial no controle biológico de uma diversidade de alvos (RUIU et al., 2007).

Singer em 1981 relatou cepas patogênicas à larvas do coleóptero, *Lasioderma serricone* e foi a partir de então que surgiram outros trabalhos em busca de atividade entomocida nesta espécie. Devido ao seu potencial biotecnológico, novos testes em diferentes alvos com importância médico-veterinária e na agricultura foram realizados, tais como: larvas de *C. quinquefasciatus* além de *A. aegypti* e *S. vittatum* (FAVRET; YOUSTEN, 1985). Rivers et al. (1991) demonstrou que algumas cepas possuíam atividade para díptera (*Culex* e *Aedes*) outras para coleóptero e outras possuíam atividade em ambas as ordens de inseto (*A. aegypti* e *L. serricone*). Singer em 1996 citou algumas estirpes que apresentavam atividade contra o nematódeo fitoparasita *Heterodera glycines* causador de danos à agricultura e outras que eram tóxicas para nematódeos zooparasitas *Trichostrongylus colubriformis*, além do molusco *Dreissena polymorpha*. Ainda segundo Oliveira et al. (2004) larvas de Coleóptera, *Anthonomus grandis*, Lepidoptera, *Anticarsia gemmatalis* e molusco *Biomphalaria glabrata* foram suscetíveis à atividade tóxica de algumas estirpes. Mais recentemente trabalhos como Ruiu et al. (2006) tem promovido bioensaios em *Musca domestica*, onde descreve alguns efeitos letais e subletais como modificações no desenvolvimento e tempo de vida, além de menor fecundidade em adultos, sugerindo ainda que sua atividade patogênica pode estar ligada ao esporo. Apesar de vários trabalhos na busca da atividade entomocida desta bactéria, sua patogenicidade ainda não está bem esclarecida. Sugestões de alguns autores dizem estar associada à parede celular ou a membrana citoplasmática, diferente de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* que estão ligadas aos corpos paraesporais (OLIVEIRA, 2003).

Devido à observação de heterogeneidade em relação à atividade biocida em diferentes estirpes de *Br. laterosporus*, buscou-se encontrar marcadores moleculares que identificassem

estirpes patogênicas. Inicialmente Singer (1981) sugeriu distinguir estirpes mosquitocidas daquelas não mosquitocidas por Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). Zahner et al. (1999) mostraram que através da técnica de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) com primer OPA-01 (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) foi possível amplificar somente as estirpes mosquitocidas promovendo um marcador molecular das estirpes entomocidas de *Br. laterosporus*. Segundo os mesmos autores a amplificação resultante do uso de outro primer, OPA-11, resultou em uma banda de cerca de 900pb comum a todas as estirpes de *Br. laterosporus* analisadas, caracterizando-o como marcador molecular para a espécie. Estes dados facilitaram a triagem destas bactérias em programas de isolamento de estirpes com potencial biotecnológico e contribuíram com as questões taxonômicas deste grupo bacteriano. Foram utilizadas outras diferentes ferramentas, tais como: BOX-PCR, ITS-PCR (Internal Transcribed Spacer) e hibridização por sonda 16S rRNA. Entretanto estas não foram capazes de diferenciar estirpes quanto seu potencial patogênico (OLIVEIRA et al., 2004). Portanto, ainda é necessária a caracterização deste grupo taxonômico a fim de descrevermos melhor seu potencial e aplicabilidade.

A busca de novos alvos (artrópodes vetores com importância médico veterinária, sanitária e agricultura), a avaliação da patogenicidade, a caracterização molecular para detecção e localização dos genes ligados à patogenicidade entre estirpes de *Brevibacillus laterosporus* podem contribuir com a aplicação deste microrganismo no controle biológico.

2.5 Ctenocephalides felis felis

2.5.1 Distribuição geográfica

A ordem Siphonaptera é constituída por aproximadamente 3.000 espécies e/ou subespécies incluídas em 238 gêneros e 15 famílias distribuídas da região Ártica até a Antártica. No Brasil, devido a diversidade de biomas existentes, apenas 59 espécies foram descritas, sendo incluídas em oito diferentes famílias (LINARDI; GUIMARÃES, 2000). Estes são principalmente parasitas de animais domésticos e silvestres, é um dos grupos de insetos mais conhecidos, por estar associado com o homem e animais domésticos ou de companhia o que permitiu um estreito convívio, frequentando sua moradia ou habitando em lugares muito próximos a estas (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; RODRIGUES et al., 2001; SHAW et al, 2004). Dentre as espécies da ordem Siphonaptera que afetam cães e gatos *C. felis felis* é a mais amplamente distribuída no mundo e do ponto de vista epidemiológico despertam atenção por serem vetores de inúmeros patógenos (CAÑÓN-FRANCO; PÉREZ-BEDOYA, 2010).

Existem quatro subespécies de *C. felis*, todas primariamente ectoparasitas de carnívoros. A subespécie *C. felis strongylus* e *C. felis darmarensis* estão restritas à África, e *C. felis orientis* é encontrada no sudeste da Ásia e das Índias Orientais. No Continente Americano, a única subespécie encontrada é a *C. felis felis*, apesar de também ser encontrada em todo o mundo, parasitando muitas espécies de animais selvagens e domesticados (RUST; DRYDEN, 1997). Na América do Norte, a infestação por pulgas em cães e gatos é tida como a ectoparasitose mais comum (DRYDEN; RUST, 1994; RUST, 2005). No Sudeste da África as pulgas são os parasitos mais comuns encontrados em cães e gatos. Embora várias espécies de pulgas tenham sido encontradas em cães e gatos nos Estados Unidos, *C. felis felis*, é a mais prevalente, sendo encontrada em grande parte dos cães e gatos da Virgínia e portanto os gastos anuais com produtos para controle destes insetos em animais de estimação nos EUA excedem US\$ 1 bilhão (CONNIFF, 1995).

2.5.2 Biologia

As pulgas, independente de sua espécie, são insetos com metamorfose completa, sendo seu ciclo biológico dividido em quatro fases diferenciadas: ovo, larva, casulo pupal e adulto (DRYDEN, 1993). O ciclo biológico se inicia quando sobre o hospedeiro normal, que é reconhecido pelo calor, visão e emissão de CO₂, ocorre o acasalamento e a fêmea inicia seu repasto e posterior defecação, o que pode ocorrer rapidamente, por ser este o alimento para as larvas. Após 24/48 horas do repasto inicia-se a postura, estes ovos cairão sobre o solo e apenas com umidade acima de 50% e temperaturas amenas ocorrerá o seu desenvolvimento. A eclosão das larvas, etapa em que passa fora do hospedeiro, pode variar de dois a dezesseis dias dependendo das condições ambientais. Elas apresentam aparelho bucal mastigador e alimentam-se de excrementos de pulgas adultas incorporados a detritos orgânicos e dejetos dos hospedeiros, sua longevidade vai depender de alimentação e busca por fontes úmidas. Segundo Silva et al. (2008) os três estágios larvais (L1, L2, L3) podem durar de uma a duas semanas, ocorrendo duas mudas de cutícula, já no final do seu desenvolvimento, o terceiro instar larval deixa de se alimentar e esvazia seu trato digestivo, iniciando a produção de cemento pelas glândulas salivares, para a formação do casulo pupal, que pode ser nua ou encasuladas, sendo portanto revestidos de qualquer sujidade ambiental como grãos de areia ou outro tipo de resíduo, onde poderá ficar por 7 a 10 dias até a emergência do adulto. Os adultos provenientes de pupas nuas emergem mais precocemente da cutícula pupal do que os encasulados. Em *C. felis felis* o ciclo total pode durar de 17 a 22 dias, porém em condições extremas a forma de pupa poderá manter-se por longo período (LINARDI; GUIMARÃES, 2000; LINARDI, 2004; MELO et al., 2007).

2.5.3 Importância médico-veterinária

O interesse pelo estudo dos Siphonapteros só tomou maiores proporções quando se correlacionou as pulgas com a transmissão da peste bubônica. Isto devido ao fato de poderem transmiti-la de quatro maneiras: 1) por regurgitação dos bacilos da peste (*Yersinia pestis*) no momento da picada, devido a um bloqueio da porção medial do tubo digestivo, criando um tipo de biofilme na válvula do proventrículo, pela colônia de bacilos (RAIL et al., 1980; ERICKSON et al., 2006); 2) por fezes de pulgas infectadas no local de atrito na pele; 3) pela ingestão de pulgas infectadas; 4) a partir de esfolamento de animais infectados. O modo mais comum de transmissão da peste é o primeiro. Através desta rota, os bacilos que se encontram no proventrículo, uma estrutura bulbosa que se junta ao esôfago e estômago das pulgas e funciona como uma válvula para evitar regurgitação a partir do seu estômago, se multiplicam muito rápido, e formam uma massa gelatinosa, que evita a continuação da ingestão de sangue. Posteriormente, como as pulgas tentam se alimentar, a pressão faz com que o bacilo seja regurgitado com a alimentação para a ferida. A peste ocasiona a morte das pulgas, pois ocorre uma obstrução, e as mesmas acabam bloqueadas devido a um enforcamento de seu trato digestório (DRUCKER; KOTTKAMP, 1986).

Além deste patógeno, atualmente a espécie *C. felis felis* está relacionada com a transmissão entre animais e o homem de uma diversidade de outros agentes infecciosos de graves enfermidades como: *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, *Dipylidium caninum*, *Mycoplasma spp.*, *Yersinia pestis* e o Vírus da Leucemia felina (HORNOK et al., 2010; CANÓN-FRANCO; PÉREZ-BEDOYA, 2010; McELROY et al, 2010). Independentemente da transmissão de moléstias aos respectivos hospedeiros, as pulgas exercem sobre eles diversas ações, como ectoparasitos. Dentre essas ações, pode ser citada a ação irritativa e espoliativa, provocada pelo efeito da picada, inoculação de saliva e continua hematofagia, provocando reações alérgicas de intensidade variada (LINARDI, 2004).

2.5.4 Controle Químico e Resistência

As infestações por pulgas continuam sendo um dos maiores problema em cães e gatos. Consideráveis avanços têm sido feitos na metodologia do controle de pulgas nos últimos anos (JACOBS et al., 2001). Porém os programas de controle têm como base a combinação harmônica de métodos mecânicos/culturais (manejo das condições ambientais) e de métodos químicos (uso adequado de produtos seletivos) (PEREIRA; SANTOS, 1998). Entretanto o sucesso ou o impacto econômico dos ectoparasitos é usualmente um resultado direto de sua abundância e é frequentemente associado com o rápido aumento em sua densidade populacional (COOP et al., 2002).

A primeira etapa para o controle mecânico de pulgas, segundo Linardi e Guimarães (2000) nos animais domésticos, como cães e gatos de pêlo curto, é a higiene aliado a catação manual e a retirada mecânica das pulgas frequentemente. O controle mecânico deste parasito envolve muitos aspectos, inclusive o sociocultural.

Na segunda etapa os muitos produtos químicos usados para controlar infestações por ectoparasitos de importância veterinária são neurotoxinas seletivas para o sistema nervoso de artrópodes. Recentemente houve uma significativa redução na utilização dessas neurotoxinas principalmente devido ao aparecimento de resistência dos ectoparasitos e um maior interesse humano pela segurança ambiental. Novos compostos têm sido utilizados, incluindo a introdução de RCI's (Reguladores de crescimento dos insetos). O alvo primário do controle de ectoparasitos em animais de companhia é a pulga *C. felis felis*, por todas as injúrias causadas aos seus hospedeiros. Os compostos ativos contra ectoparasitos podem ser categorizados em larvicidas (controle ambiental) e adulticidas (controle no hospedeiro). Alguns compostos também podem possuir ambas as propriedades, larvicida e adulticida. A maioria dos produtos veterinários comerciais contém os dois ativos, inseticidas adulticidas como fipronil, imidaclopride, selamectina e RCI's, como lufenuron e piriproxifen (COOP et al., 2002). Se um animal de estimação é infestado, deve ser tratado ao mesmo tempo em que a casa, ou o animal vai infestar continuamente a casa e vice-versa. Se o domicílio contém mais do que um animal de estimação, todos os animais devem ser tratados ao mesmo tempo ou as pulgas irão migrar a partir do animal de estimação tratado para o sem tratamento (RUST, 2005). Apesar de alguns desses produtos poderem ser benéficos, faltam mais provas científicas da sua eficiência e segurança (BAKER; FARVER, 1983; KOEHLER et al., 1986).

O controle das infestações de animais de companhia por pulgas é uma dificuldade comum, em parte por causa da relutância dos proprietários em considerar o uso de inseticidas tópicos e também pela higiene inadequada do ambiente onde permanecem os animais (BLAGBURN et al., 1995).

Portanto alguns trabalhos vêm discutindo a forma de controle deste vetor, porém de acordo com Rust (2005) e Silva et al. (2008) apenas o controle químico vem sendo aplicado atualmente e o desenvolvimento de resistência já foi encontrada contra ciclodienos, carbamatos, organofosforados e piretróide.

A resistência a inseticidas é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o desenvolvimento da habilidade de uma cepa de um determinado organismo em tolerar doses de um produto tóxico capaz de promover a morte da maioria dos indivíduos da população normal da mesma espécie. Bossard et al. (1998) reportou a resistência em oito espécies de pulgas em 1980, incluindo três espécies de notável importância em saúde pública: *C. felis*; *P. irritans*; e *X. cheops*. Sendo, portanto, mecanismos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos dos insetos os principais fatores responsáveis pelo aparecimento da resistência aos inseticidas (ROUSH, 1993). A pressão de seleção exercida por um inseticida a

certa população, estimula a habilidade de evitar seus efeitos nocivos. Este evento está relacionado aos mecanismos de resistência comportamental.

A solução encontrada para esta problemática é a necessidade de um esforço interdisciplinar (variadas formas de controle) com o objetivo de retardar a evolução da resistência, empregando metodologias de redução da pressão de seleção, preservação de indivíduos susceptíveis, restrição na utilização de pesticidas e aplicação de fármacos nos estádios mais vulneráveis (principalmente formas imaturas). A evolução da resistência a inseticidas em populações de insetos é influenciada principalmente por fatores genéticos, biológicos e ecológicos, na qual podem variar conforme a espécie acometida, a população acometida e o habitat em que vivem estes insetos. A identificação primária desses fatores pode indicar o potencial evolutivo da resistência. Os efeitos fisiológicos de resistência de *C. felis felis* aos inseticidas não tem sido determinada com certeza, porém das espécies de pulgas testadas, esta é resistente ao maior número de diferentes inseticidas (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977).

2.5.5 Ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”

O conhecimento baseado em inúmeros estudos do ciclo biológico de *C. felis felis* forneceram subsídios para a criação de pulgas em laboratório sob condições artificiais. Diversos autores avaliaram as variáveis que tem influência sobre o desenvolvimento do ciclo de vida das pulgas, tais como: temperatura, umidade, alimentação e reprodução e concluíram que é necessário o ajuste destes parâmetros para que ocorra o desenvolvimento dos diferentes estágios de crescimento de forma artificial (SILVERMAN et al. 1981; PULLEN; MEOLA, 1995; METZGER; RUST; DRYDEN, 1997). De acordo com Linardi et al. (1997) e Correia et al. (2003) em testes “*in vitro*” o sangue desidratado de mamíferos de grande porte pode ser empregado como alimento às larvas, porém são necessários suprimentos protéicos como farelo de trigo ou levedo de cerveja que adicionados a dieta artificial aumentam o valor nutricional perdido na desidratação do sangue e não interferem na manutenção de uma colônia nem na duração média do ciclo de vida de *C. felis felis*. Vieira e colaboradores (2010) em testes com diferentes dietas merídicas oferecidas as larvas em ensaios “*in vitro*” concluiu que a origem do sangue empregado não interfere significativamente no percentual de emergência dos adultos de *C. felis felis*, podendo-se optar pela espécie animal disponível para o preparo da dieta artificial, aliada a suplementação com farelo de trigo, para suprir eventual perda nutricional decorrente da desidratação do sangue. Mehlhorn et al. (1999) demonstraram em ensaio “*in vitro*”, que adultos e larvas de *C. felis felis* morreram rapidamente quando entraram em contato com papel filtro impregnado com uma solução aquosa de imidacloprid ou em contato com pêlos de cães tratados com uma formulação “spot-on”. McTier et al. (2003) expuseram as larvas ao contato com diferentes produtos químicos (selamectina, fipronil e imidacloprid) através da mistura com areia e fezes de pulgas adultas, concluindo que a selamectina é mais efetiva do que o fipronil e imidacloprid no controle ambiental deste inseto. Já Correia et al. (2008) avaliaram a atividade residual das diferentes formulações de dinotefuran através dos pêlos de cães tratados, ao expor as larvas e adultos em tubos de ensaios com a dieta e os pêlos, como resultado foi possível afirmar que o resíduo do produto foram eficazes por um período de 44 dias nos estágios de larva e de adultos períodos de 16 e 23 dias.

Em formas alternativas de controle como, por exemplo, o controle biológico existe poucos relatos na literatura para pulgas. Melo et al. (2007) descreveram a infecção da cutícula da pulga pelo fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e concluiu que estes agentes entomopatogênicos são promissores para o controle de ovos e adultos de *C. felis felis*. Rugar et al. (2003) em sua patente avaliou a ação patogênica do cristal liofilizado de uma estirpe de

B. thuringiensis misturado a dieta para larvas, composta de sangue, esta formulação mostrou-se eficaz para o controle das larvas de *C. felis felis*.

De acordo com Rust (2005) o desenvolvimento de bioensaio para avaliar atividade dos produtos químicos e biológicos é extremamente importante, porém bioensaios em adultos requerem um grande número de indivíduos o que torna difícil pois apenas 5% da população de pulgas são adultos os outros 95% estão entre ovos e larvas, além da dificuldade pela manutenção fora do hospedeiro. Já com estádios mais vulneráveis (larvas e ovos) é necessário menos indivíduos e sem a manutenção de uma colônia em laboratório. Como descrito por Marchiondo et al. (2007), no guia da Associação Mundial para avanço da Parasitologia Veterinária para testes com fármacos utilizados no controle de pulgas e carrapatos em cães e gatos, a importância dos testes “*in vitro*” é o auxílio na definição efetiva da eficácia de novos produtos antes de aplicados “*in vivo*” e a redução do número de animais usados em testes.

2.6 Marcador Molecular

2.6.1 Eletroforese de isoenzimas (MLEE-Multilocus Enzyme Electrophoresis)

A ferramenta tradicional mais utilizada para indicar as variações moleculares das proteínas é a eletroforese, que tem por finalidade a separação de moléculas ionizadas, por suas cargas elétricas e pesos moleculares. Moléculas que apresentam carga positiva migram para o pólo negativo e moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo e a carga total das moléculas de proteínas será então a soma delas com o pH do tampão em que será dissolvida. Portanto em pH neutro os aminoácidos assumem suas próprias cargas e as diferenças na mobilidade eletroforética das proteínas, que varia conforme a carga elétrica, forma estrutural ou peso molecular, torna possível diferenciar microrganismos. Estas diferenças na mobilidade das proteínas podem refletir em diferenças estruturais ao nível molecular. Porém este método apresenta dificuldades na interpretação de resultados, pela inúmera presença de bandas obtidas. Após serem submetidas a um campo elétrico e métodos histoquímicos a visualização do produto da atividade catalítica de enzimas é denominado isofuncionais ou também isoenzimas, portanto isoenzimas são definidas como múltiplas formas moleculares para uma mesma enzima, ocorrendo tanto individualmente quanto em diferentes membros de uma mesma espécie (ALFENAS et al., 1991). Estas enzimas podem ter a mesma função de catálise, entretanto apresentarem cinéticas de reação diferente, podendo ainda ocorrer na mesma célula, em diferentes tecidos ou estágios diferentes de desenvolvimento de um determinado indivíduo (HARRIS; HOPKINSON, 1976). Desta forma a propriedade de migração por parte das proteínas, quando submetidas a um campo elétrico aliado a possibilidade de se visualizá-las através de métodos histoquímicos, pode ser utilizada como ferramenta auxiliar na classificação e identificação de bactérias, fungos e nematóides (ALFENAS et al., 1991). A caracterização dos isolados ocorre pela mobilidade eletroforética de um amplo número de enzimas celulares. A distância de migração da enzima, durante a eletroforese, é determinada pela sequência de aminoácidos, que são variantes de mobilidade (eletromorfos ou aloenzimas) de uma enzima e podem ser diretamente controladas por alelos ou genes situados em diferentes “locos”.

Após sua separação por eletroforese, as isoenzimas são identificadas por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Cada banda revelada corresponde a uma enzima, tendo sua síntese controlada por um, dois ou mais genes, logo os fenótipos enzimáticos observados podem ser interpretados em termos de genótipo, ou seja, genes. A diferença observada na mobilidade relativa dessas enzimas pode refletir em diferenças estruturais ao nível molecular permitindo então que seja avaliada a correlação entre gene e enzima (HARRIS; HOPKINSON, 1976), sendo, portanto as isoenzimas originadas da

presença de mais de um “loci”, que codifica para a enzima (múltiplos locos); pela presença de mais de um alelo, para o “loco” que codifica a enzima (alelismo múltiplo) ou por modificações pós-traducionais na cadeia polipeptídica (isoenzimas secundárias) (HARRIS; HOPKINSON, 1976).

A análise isoenzimática tem sido empregada na identificação de táxons desconhecidos, para estimar a variabilidade genética em populações, descrever origem de patógenos. Os caracteres isoenzimáticos são usados como caracteres fenotípicos, portanto tem como principal vantagem o acesso a mais de cem caracteres independentes, permitindo uma melhor classificação dos diferentes isolados (BAPTIST et al., 1978).

Outras aplicações para as isoenzimas podem ser marcadores genéticos, sendo úteis no estudo da estrutura de populações, acompanhar processos de epidemias, traçar origem de novas variantes patogênicas, analisar cruzamentos e estabelecer relações entre o ciclo de vida de diferentes organismos (VILLAS-BOAS et al., 2002).

Os dados isoenzimáticos aliados a taxonomia numérica são frequentemente utilizados na sistemática bacteriana e genética de populações, podendo-se citar diversos trabalhos em diferentes grupos, tais como: *Pseudomonas aeruginosa* (LOMHOLT et al., 2001); *Vibrio* (FREITAS et al., 2002); *Campylobacter jejuno* e *Campylobacter coli* (MOORE et al., 2002); *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (HELGASON et al., 2000).

Em *B. laterosporus*, segundo Zahner (1998) através da técnica de isoenzimas não foi possível discriminar estirpes entomopatogênicas das que não apresentam este potencial, como foi viável em cepas de *B. sphaericus*, porém sendo possível observar que este grupo apresenta cepas altamente relacionadas entre si.

2.6.2 Taxonomia numérica

A Taxonomia numérica estabeleceu-se pelo estudo de objetos e organismos que deveriam ser analisados através de caracteres com pesos iguais e tendo um número de caracteres em comum, que avalia afinidades ou similaridades entre unidades taxonômicas e a ordenação destas em taxa com base em suas afinidades. Para isso é necessário o agrupamento de organismos conhecidos como Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs, Operational Taxonomic Units) por métodos numéricos, com base em seus estados de caracteres (SNEATH; SOKAL, 1973). O termo caracter é definido como uma propriedade que pode variar entre duas unidades taxonômicas operacionais. Os valores que o caracter pode assumir são chamados “estados de caracter”.

A ordem operacional da Taxonomia Numérica é dada em quatro etapas principais: a- os organismos e caracteres são escolhidos e registrados; b- as semelhanças entre organismos são calculadas; c- os *taxa* são criados em função destas semelhanças; d- generalizações são feitas sobre os *taxa*. Sendo assim, os dados gerados através da eletroforese são tabulados. A tabulação é normalmente expressa em modo binário, através dos valores 0 ou 1. O primeiro indica ausência e o segundo presença do caracter, resultando então em uma matriz binária de dados $t \times n$, sendo t representado pelas Unidades Taxonômicas Operacionais (neste trabalho as enzimas), e n os caracteres (neste trabalho os tipos eletroforéticos).

Para a análise da Taxonomia Numérica trabalha-se com diferentes coeficientes matemáticos que calculam a semelhança (ou diferença) entre cada par de OTU de uma matriz de dados. A aplicação destes coeficientes é o segundo passo na análise numérica. Existem vários coeficientes, sendo os mais utilizados em estudos no ramo da bacteriologia, os de associação, Coeficiente de Concordância Simples (SSM) e Coeficiente de Jaccard (SJ), ambos são coeficientes de similaridade, que podem estabelecer as relações existentes entre os grupos em estudo (SNEATH; SOKAL, 1973).

Sendo considerado o mais simples o coeficiente de concordância simples, é expresso através da fórmula: $SSM = \frac{a+d}{a+b+c+d}$, onde numa comparação entre duas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO 1 e UTO 2), onde **a** é igual ao número de caracteres coincidentemente positivos entre as duas UTOs em análise; **b** é igual ao número de caracteres presentes na UTO 1 e ausentes na UTO 2; **c** é igual ao número de caracteres presentes na UTO 2 e ausentes na UTO 1 e **d** é igual ao número de caracteres ausentes nas duas UTOs em estudo.

O coeficiente de Jaccard não utiliza concordâncias negativas, tal como o coeficiente anterior, sendo expresso pela fórmula: $SJ = \frac{a}{a+b+c}$, sendo que os termos **a**, **b** e **c** tem o mesmo significado que em SSM. É importante ressaltar que não existe um coeficiente melhor ou mais correto do que o outro (SNEATH; SOKAL, 1973).

O resultado após a aplicação do coeficiente matemático é uma matriz de similaridade **t x t**, onde **t** é igual ao número de Unidades Taxonômicas Operacionais. As colunas e linhas existentes nesta matriz correspondem à comparação entre os pares de UTO, sendo a diagonal a comparação de uma UTO com ele mesmo. A matriz de similaridade resultante indica o grau de semelhança entre cada par de UTOs, não dando a idéia da relação entre todas UTOs envolvidas.

Devido a matriz de similaridade ser insuficiente para gerar as relações entre todas as UTOs, é necessário a utilização de técnicas de análise de agrupamentos que poderão gerar um dendrograma ou fenograma, através de diferentes algoritmos. O método mais utilizado é o de pareamento de grupos por média aritmética não ponderada UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), este método não ponderado de agrupamento utiliza a média aritmética da similaridade entre as UTOs. Assim é procurado na matriz de similaridade o maior valor de semelhança entre os pares de UTOs e este par é tomado como base para os agrupamentos posteriores. Através do UPGMA é computada a média de similaridade entre o UTO candidato e o agrupamento já existente. Cada Unidade Taxonômica Operacional é submetida à comparação com os agrupamentos formados. Sendo assim, estarão no mesmo grupo os UTOs mais semelhantes e o resultado final deste processo, é a relação entre todos os UTOs em estudo (SNEATH; SOKAL, 1973).

No dendrograma resultante os valores de similaridade variam de zero a um, onde zero significa ausência de similaridade, e um o grau máximo de semelhança, valores intermediários indicam diferentes graus de afinidade.

A exatidão do dendrograma em relação a matriz de similaridade original é oferecida através do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) (SNEATH; SOKAL, 1973), que leva em consideração o grau de ajuste entre a matriz fenética original e a cofenética resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento. Este coeficiente proporciona um valor que indica se o dendrograma resultante é realmente representativo da matriz de similaridade. Se houver um ajuste perfeito entre o valor de CCC será igual a 1.0. Entretanto valores em torno de 0.85 são permitidos.

O grande desenvolvimento da Taxonomia Numérica atual deve-se ao fato de que nas últimas décadas a computação tem avançado velozmente. Portanto, os dados isoenzimáticos aliados à taxonomia numérica são utilizados na sistemática bacteriana e genética de populações porque permitem inferir que a motilidade eletroforética está relacionada à variação alélica de genes específicos, codificadores de proteínas específicas. Segundo Selander et al. (1986) quanto maior o número de enzimas testadas melhor será o modelo representativo do gene estrutural do genoma bacteriano. A aplicação desta técnica molecular permitiu que Zahner e Momen (1995) distinguissem estirpes patogênicas de não patogênicas de *B. sphaericus* através de um alelo diagnóstico (ADH-2). Este alelo tornou-se um marcador molecular, que é definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de segmento específico de DNA, para cepas entomopatogênicas. Entretanto,

Silveira e colaboradores (2001) obtiveram resultado diferente, quando submeteram estirpes de *Escherichia coli* a técnica de MLEE foram isolados diferentes grupos principais, porém não foram capazes de correlacionar com perfil de patogenicidade. Já Régua-Mangia et al. (2003) quando analisaram *E. coli*, isolados a partir de crianças, detectaram sorogrupos e sorotipos na população estudada, concluindo que a técnica MLEE pode ser promissora para a detecção de subgrupos patogênicos bem como para o potencial virulento específico. Contudo para as estirpes de *B. laterosporus*, segundo Zahner et al. (1999) através da análise de 9 enzimas testadas (Malato desidrogenase, Lactato desidrogenase, Nucleosídeo fosforilase, Alanina desidrogenase, Aconitase, Fosfoglucose isomerase, Enzima malica, Peptidase) não foi possível discriminar estirpes entomopatogênicas de não patogênicas. Portanto este trabalho pretende complementar os achados de Zahner et al. (1999), aumentando o número de enzimas testadas para tentar agrupar as estirpes entomopatogênicas.

2.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction)

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica que amplifica, “*in vitro*”, segmentos específicos de DNA através da desnaturação pelo calor, pareamento com “primers” (iniciadores) específicos e polimerização com enzimas (DNA polimerase), gerando-se milhões de fragmentos idênticos ao DNA investigado. Esta técnica permite amplificar uma determinada sequência do DNA sem a necessidade do uso das tradicionais técnicas de clonagem molecular pelas quais se introduz plasmídeos em bactérias. A condição básica para a sua aplicação depende da construção de oligonucleotídeos (iniciadores) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação, os quais são complementares as duas fitas opostas do DNA e que estejam flanqueando a sequência a ser amplificada (OLIVE; BEAN, 1999).

Um ciclo de PCR envolve três etapas fundamentais: a desnaturação da fita dupla do DNA que contém a sequência a ser amplificada, em temperaturas que podem variar de 92°C a 95°C, quando nesta temperatura as duas fitas do DNA se separam; o passo seguinte consiste em abaixar a temperatura para níveis entre 35°C a 60°C, o que vai depender do tamanho e sequência do “primer” utilizado, permitindo que os oligonucleotídeos anem-se, especificamente, nas extremidades flanqueadas da sequência alvo e nas fitas opostas e, finalmente, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA-polimerase realize a extensão, a partir de cada terminal 3’ dos “primers”, que envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta seja sintetizada. Estes ciclos são repetidos por algumas dezenas de vezes, e a cada ciclo a quantidade de DNA da sequência alvo dobra.

Um avanço técnico no processo surgiu com a descoberta da Taq polimerase oriunda da bactéria *Thermus aquaticus*. Esta enzima tem temperatura ótima de ação a 72°C, mas permanece estável mesmo a 94°C e, com isto, a enzima é adicionada uma única vez na reação. Devido a este fato, foi possível a automatização do processo nos denominados termocicladores.

A técnica de PCR, que permite amplificação rápida de DNA, tem revolucionado as técnicas de diagnóstico de várias doenças, a caracterização de genes e também a forma escolhida para a realização de buscas por novos isolados. A PCR segundo MULLIS e FALOONA (1987) tornou-se essencial na caracterização de isolados a partir de regiões conhecidas dos genes, além de comparar isolados pouco conhecidos e indicar a especificidade de cada gene para várias ordens de insetos-praga (CAROZZI et al., 1991; BRAVO et al., 1998; PORCAR; JUAREZ-PEREZ, 2003).

Através da análise por PCR da sequência do gene 16S rRNA de algumas estirpes de *B. brevis* e *B. aneurinolyticus*, Shida et al (1996) propôs a reclassificação e separação destas

espécies em dois novos gêneros: *Brevibacillus* gen. nov. incluindo dez espécies e *Aneurinibacillus* gen. nov. incluindo duas espécies. Ainda, após o alinhamento da sequência do gene 16S rRNA foi possível o desenho dos primers que permitem a diferenciação entre os dois novos gêneros criados (primers BREV 174F, ANEU 506F e 1377R), sendo, portanto uma ferramenta útil para a caracterização dos isolados em estudo. Entretanto, como desvantagem, esta técnica exige o conhecimento prévio da informação genética das sequências-alvo, o que foi solucionado com criação da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

2.6.4 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD-PCR - Random Amplified Polymorphic DNA)

Esta técnica foi descrita para contornar o problema do desconhecimento prévio da sequência de DNA que se deseja amplificar, possibilitando sua utilização em organismos onde sequências de DNA não são conhecidas, portanto baseia-se na técnica de PCR e utiliza oligonucleotídeos curtos de 9 a 10 pares de base (iniciadores) de sequência nucleotídica arbitrária (OLIVE; BEAN, 1999). A reação ocorre em condições de baixa estringência, permitindo que ocorra o pareamento entre os iniciadores e o DNA molde nas fitas paralelas em orientação oposta. A DNA polimerase termoestável sintetiza então uma sequência complementar, situada entre os dois primers, dando origem a novos fragmentos que servirão de molde para as reações subsequentes. Atualmente existem “KITS” comerciais que oferecem oligonucleotídeos de 10-mer como os da Operon Technologies, Alameda, CA, USA e Amersham Pharmacia (“Ready to go”) liofilizados. Os primers que serão utilizados possuem sequência arbitrária, mas a amplificação não vai ocorrer ao acaso e sim em lugares específicos do genoma. Para o resultado os produtos da reação de RAPD devem ser separados por eletroforese em gel, estes produzirão um padrão de bandas específicas conhecido como impressão digital genômica (DNA “fingerprint”). Os “fingerprints” permitem distinguir diferentes espécies e, até mesmo, populações distintas da mesma espécie (OLIVEIRA, 2003). O RAPD permite a análise de um grande número de “locus” independente, sendo assim, representativo do genoma total (WILLIAMS et al., 1990; WELSH; McCLELLAND, 1990). Algumas vantagens desta metodologia são: requerer pouca quantidade de DNA molde, não necessariamente precisa estar altamente purificado, os mesmo primers podem ser usados para diferentes fins e não é necessário o conhecimento da sequência alvo. Para esta técnica os primers para amplificação contem conteúdo GC variando em torno de 60% e poucas bases nucleotídicas, sendo no máximo 20pb (STACKEBRANDT et al., 2002). Os polimorfismos ou diferenças em padrão de bandas observados na eletroforese podem ser causados por alguns fatores: presença ou ausência de sítios de anelamento (alteram a habilidade destes de se ligarem ao DNA); inserções que provocam um aumento no tamanho da sequência a ser amplificada; ou deleções que reduzem o tamanho da sequência a ser amplificada. Estes polimorfismos podem indicar diferenças inter ou intra específicas, sendo, portanto, úteis em fins de diagnóstico ou na epidemiologia, como marcadores moleculares de DNA (WILLIAMS et al., 1990). Segundo Rai et al. (2006) é necessário a utilização de mais que um primer nas análises de RAPD, pois podem amplificar diferentes partes do genoma e promover maior diversidade entre as estirpes. A tecnologia de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) é muito utilizada na obtenção de informações para análises filogenéticas (WILLIAMS et al., 1990). O estudo de perfis plasmidiais de isolados de *B. thuringiensis* tem demonstrado informações importantes na caracterização de isolados de bactérias. De acordo com Kumar et al. (2010) a técnica de RAPD promoveu um alto grau de discriminação entre os isolados de *B. thuringiensis*, sendo formados alguns grupos que estão de acordo com a região geográfica dos isolados, portanto estirpes da mesma região ocupam o mesmo grupo. Esta

técnica quando aplicada as estipes de *Br. laterosporus*, segundo Zahner et al. (1999) apresentou um alto nível de polimorfismo para os primers OPA-01, OPA-02, OPA-11. Ainda segundo os mesmos autores com o primer OPA-01 foi possível amplificar o DNA apenas das estirpes mosquitocidas, além disso, foi possível observar uma única banda de aproximadamente 900pb em todas as estirpes testadas, o que permitiu identificar um marcador molecular para a espécie de *Br. laterosporus*. Já o primer OPA-02 apresentou um alto nível de polimorfismo. Portanto, este método é ideal para o estudo de microrganismos ou com crescimento lento, difíceis de serem cultivados em grande escala ou que não se tenham sobre eles muita informação, como é o caso de *Br. laterosporus*.

2.7 Perfil Plasmidial

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares ou lineares extracromossomais, presentes em muitas espécies bacterianas. Sua importância está ligada às vantagens adaptativas conferidas às células bacterianas, como: sobrevivência em condições ambientais diversas e resistência as drogas agressivas, metais pesados ou toxinas celulares (AZEVEDO et al., 2003). Os genes responsáveis pela atividade inseticida na maioria das estirpes bacterianas são carregados por plasmídeos. A identificação dos plasmídeos e das bactérias que os carregam representa uma ferramenta de comparação entre diferentes estirpes bacterianas e esse conhecimento propicia informação sobre a evolução e ecologia bacterianas (MEIRELES et al., 2002). A análise do perfil plasmidial foi a primeira técnica baseada em DNA de pequenos fragmentos para rastreamento epidemiológico e ou patogênico (LÁZARO et al., 2004). Estudos têm demonstrado que este método de tipagem se constitui numa ferramenta discriminatória na caracterização de amostras bacterianas entre outras (MALOW et al., 1993). A técnica de extração plasmidial baseia-se na lise e separação de suas frações por centrifugação. Alguns fatores são preponderantes nas etapas realizadas: o peso do plasmídeo, as estirpes testadas, e a técnica que será usada subsequentemente para a purificação do plasmídeo (KADO; LIU, 1981).

De acordo com Van der Auwera et al. (2007) através da análise dos plasmídeos de diferentes espécies do gênero *Bacillus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*), foi possível identificar a presença dos mesmo conferindo a estas espécies a patogenicidade e demonstrar que a passagem deles entre as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* podem conferir as estirpes onde antes este plasmídeo eram ausentes a capacidade de causar patogenicidade entre diferentes indivíduos.

Segundo Rolle et al. (2005) os genes que codificam para as endotoxinas de estipes de *B. thuringiensis* estão localizadas em plasmídeos de peso entre 45 e 1000Kb e esta variedade de pesos são fatores diagnósticos para a caracterização das subespécies desses entomopatôgenos formadores de esporo e cristais. Embora o estudo destes elementos extracromossomais de DNA genômicos possam auxiliar em varias áreas, algumas limitações relacionadas ao tamanho e números de cópias presente nos organismos analisados poderão ocorrer e a solução para esta problemática é a utilização de diferentes métodos de corrida eletroforética, como exemplo: PFGE e eletroforese convencional (LÁZARO et al., 2004).

2.8 Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE- Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Com o advento da técnica de PFGE, que permite a separação de fragmentos de DNA de grande tamanho (desde quilobases até megabases), surgiram novas abordagens ao estudo da organização de genomas (MAGALHÃES et al., 2005). De acordo com Tenover et al. (1995) na eletroforese com alternância periódica do campo elétrico, as moléculas são permanentemente forçadas a modificar a orientação em que se movem. Quanto mais longa for

a molécula, maior o tempo que necessita para que encontre uma orientação que favoreça o movimento ao longo do gel (TENOVER et al., 1995). Estes são os princípios que determinaram a criação de configurações que permitissem a aplicação de dois campos elétricos, com diferente orientação, a um gel de agarose. Foram desenvolvidos aparelhos com diversos tipos de configurações de elétrodos. O sistema de campo elétrico homogêneo, (CHEF, "contour-clamped homogeneous electrical field") é atualmente o mais usado e apresenta uma série de elétrodos dispostos nos lados de um hexágono e com os dois campos elétricos formando um ângulo de 120° (BASIM; BASIM, 2001). Ao longo de cada um dos lados do hexágono forma-se uma distribuição gradual de potenciais, resultando num campo elétrico homogêneo em todo o gel e, conseqüentemente, corre perfeitamente reto. Este tipo de configuração é atualmente muito usado para tipagem de estirpes bacterianas, nomeadamente bactérias entéricas (VAN DER AUWERA et al., 2007). Outras aplicações incluem a elaboração de mapas físicos de pequenos genomas e a cariotipagem eletroforética de pequenos organismos eucariotos. Os perfis de restrição obtidos com endonucleases de baixa frequência de corte têm sido usados por diversos autores para diferenciar estirpes da mesma espécie (TENOVER et al., 1995; ZAHNER, 1998). O procedimento pode revelar-se interessante para análise de estirpes com interesse comercial, para comparação de isolados ambientais com interesse agrícola, ou inclusivamente encontrar aplicações na análise epidemiológica de isolados clínicos (MAGALHÃES et al., 2005). Na eletroforese de campo pulsado a extração de DNA é feita com a incorporação das células bacterianas a serem lisadas em blocos de agarose, seguidas de sucessivas lavagens para remoção de interferentes (proteínas, DNAses, etc.). As moléculas de DNA de forma linear que apresentam menor peso molecular podem ser melhor visualizadas em eletroforese convencional, pois esta técnica tem limitações para a análise de DNA, onde os fragmentos poderão ter no máximo, 20 a 50 kb, necessitando o uso de agarose a muito baixa concentração para a separação de fragmentos de mais de 20 kb. Acima destes tamanhos, não há diferenças de mobilidade que permitam a separação de fragmentos de acordo com o peso molecular (TENOVER et al., 1995). Segundo Apaydin et al. (2005) a análise dos genes presentes em plasmídios permitiu mostrar a diversidade genética apresentada por *B. thuringiensis* em seu potencial tóxico. Esta técnica poderá permitir a correlação entre os perfis obtidos e patogenicidade ainda não esclarecida de *B. laterosporus*.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Estirpes Bacterianas

Neste trabalho foram utilizadas estirpes bacterianas do gênero *Brevibacillus* de diferentes origens (Tabela 1). Além disso, como grupo controle nas diversas técnicas empregadas foram utilizadas bactérias do gênero *Bacillus* como: *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*. As amostras foram cedidas pela Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* - CCGB do Instituto Oswaldo Cruz.

Tabela 1 Estirpes do gênero *Brevibacillus* e do gênero *Bacillus* empregadas neste trabalho e a descrição de sua procedência (continua).

ESTIRPES	PROCEDÊNCIA
<i>Br laterosporus</i> /NRS 340	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /CCEB 342	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 590	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 661	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1111	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1247	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1264	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1267	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1338	Rutgers University, New Brunswick, N.J.
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1642	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1643	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1645	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1646	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1647	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1648	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /NRS 1883	American Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /Shi 1	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
<i>Br laterosporus</i> /Shi 2	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
<i>Br laterosporus</i> /Shi 3	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
<i>Br laterosporus</i> /Shi 4	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
<i>Br laterosporus</i> /Shi 5	Bioenvironmental Bee Laboratory (USDA), Beltsville, MD.
<i>Br laterosporus</i> /BON 706	Institute of Higiene, University of Aarhus, Aarhus C, Denmark
<i>Br laterosporus</i> /BON 707	Institute of Higiene, University of Aarhus, Aarhus C, Denmark

Tabela 1. Continuação

<i>Br laterosporus</i> /BON 712	Institute of Higiene, University of Aarhus, Aarhus C, Denmark
<i>Br laterosporus</i> /ATCC 64	Americam Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /ATCC 6457	Americam Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /ATCC 9141	Americam Type Culture Collection
<i>Br laterosporus</i> /BL 16-92	Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow
<i>Br laterosporus</i> /BL856	Americam Type Culture Collection
<i>Br agri</i> /Ad 647	ADRIA Developpement – IDEA Unit – Interaction & dynamics of microbial ecosystems in food, France
<i>Br agri</i> /Ad 681	ADRIA Developpement – IDEA Unit – Interaction & dynamics of microbial ecosystems in food, France
<i>Br parabrevis</i> /Ad 682	ADRIA Developpement – IDEA Unit – Interaction & dynamics of microbial ecosystems in food, France
<i>Br agri</i> /Ad 541	ADRIA Developpement – IDEA Unit – Interaction & dynamics of microbial ecosystems in food, France
<i>Br agri</i> /Ad 439	ADRIA Developpement – IDEA Unit – Interaction & dynamics of microbial ecosystems in food, France
<i>Br brevis</i> /LFB 052	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos-CCGB
<i>B. thuringiensis</i> /NI 176	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos-CCGB
<i>B. cereus</i> /AL 67	Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos-CCGB

3.2 Manutenção e Cultivo Bacteriano

As amostras que foram utilizadas no trabalho encontravam-se preservadas e estocadas em freezer a -20°C como suspensão de esporos em 20% de glicerol e foram inoculadas em tubos de ensaio (16x150mm) contendo cinco ml do meio Caldo Nutriente (Merck) mantido sob agitação (Agitador Orbital New Brunswick, modelo 25D) a 150rpm, por 24, 48 e 72 horas a 33°C . Os diferentes estágios de desenvolvimento, pureza e viabilidade dos cultivos foram avaliados por microscopia óptica em preparações à fresco ou em colorações de Gram, utilizando um aumento de 1500X. Em seguida, o induto bacteriano foi retirado com uma alça bacteriológica e transferido para novos tubos de ensaio contendo cinco ml do meio Ágar Nutriente (Merck) sob a forma de “slant”, sendo colocados em estufa bacteriológica e mantidos a 33°C por 72 horas, quando ocorre a esporulação das culturas, após este período, os tubos foram estocados e mantidos a temperatura ambiente.

3.3 Obtenção das Bactérias liofilizadas

No Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS – Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) foram produzidos os liófilos utilizados neste trabalho. As amostras selecionadas para realização dos bioensaios (NRS590, NRS1111 e NI 176) foram crescidas em Ágar Nutriente a 33°C por 24, 48 e 72 horas para obtenção dos diferentes estágios de crescimento bacteriano (vegetativo, esporângio e esporo livre). A massa celular necessária foi obtida por seis tubos de ensaio de cada estágio do desenvolvimento. Após a incubação, o crescimento microbiano foi coberto com “Skim Milk” (DIFCO 0001) a 10%, retirado com o auxílio de uma alça de Drigalsky e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0,3 a 0,5 ml por ampola. Em seguida, estas foram colocadas em banho de gelo seco e etanol absoluto para congelamento rápido (até -70°C). Após um minuto de imersão no gelo, houve o congelamento, e foi em seguida transferida para um freezer a -70°C, onde ficou por 24 horas, antes de ser liofilizada. Esta etapa de congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos microrganismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais. A primeira fase do processo de liofilização (dessecação) ocorreu com o auxílio de um liofilizador (EDWARDS modelo LK4R). As ampolas foram colocadas dentro da campânula sobre um condensador, que tem por finalidade manter a temperatura a -50°C e a produção do vácuo a 10^{-1} Torr, transformando a água presente no material em vapor, evitando assim danos as células bacterianas. Após 24 horas as amostras já estavam liofilizadas e foram retiradas do liofilizador. Na etapa seguinte do processo de liofilização as ampolas foram transferidas para as cânulas do aparelho “Manifold” (árvore), onde foi produzido o vácuo necessário para evitar que o produto liofilizado entrasse em contato com a umidade e oxigênio do ambiente, pois é nesta fase que as ampolas foram seladas com o auxílio de um maçarico de chama dupla. O correto fechamento das ampolas foi conferido pelo “spart tester” (EDWARDS), onde a presença de vácuo foi determinada pela coloração azul produzida quando os elétrons dispersados pelo aparelho se chocam com os poucos gases livres na ampola. Em seguida foram realizados os testes por amostragem para a detecção de pureza, contagem de unidades viáveis e identidade da amostra. A identificação foi realizada através de provas bioquímicas após o liofilizado ter sido ressuscitado em meio de cultura Caldo Nutriente (DIFCO). A pureza do liofilizado foi determinada através da inoculação de 0.1ml de suspensão em uma placa de Petri com Ágar Sangue (Blood Agar Base – DIFCO, com 5% de sangue desfibrinado estéril) incubada a 37°C por 48 horas. Já a viabilidade foi avaliada através do crescimento em placa de Ágar Nutriente (DIFCO) a 33°C por 24 horas.

3.4 Contagem Total de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml)

A contagem foi realizada partindo de diluições seriadas, onde um mililitro do crescimento bacteriano foi alíquotado e transferido para tubo de ensaio contendo nove ml de salina (0,85%) estéril, sendo homogeneizado e um ml para os demais tubos contendo nove ml de salina até se obter a diluição a 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Das três últimas diluições foram retiradas três alíquotas de 100ul do crescimento e cada alíquota foi semeada em uma superfície de placas de Petri contendo o meio Ágar Nutriente (Merck), espalhando-se com alça de Drigalski por toda a superfície das placas, sendo em seguida incubadas em estufa (BOD Precision Scientific, modelo 815) a 33°C por até 24 horas. Após o crescimento, as unidades formadoras de colônias foram contadas a partir da média de 3 placas. O número de colônias presente em 100ul foi determinado e por regra de três foi possível encontrar o número presente em 1ml do diluído. Desta forma foi possível determinar o nº de células presentes no inóculo original. Para a contagem de colônias, foram consideradas somente as placas que forneceram de 30 a 300 colônias.

Fórmula para cálculo do nº de bactérias por ml da amostra:

nº de colônias na placa x Índice de diluição da amostra = nº de bactérias por ml da amostra

Para a contagem de UFC/ml do liofilizado, as ampolas foram pesadas e seus pesos registrados em gramas. O volume encontrado em cada ampola foi adicionado em tubos contendo nove ml de salina (0,85%) prosseguindo assim as diluições seriadas. As três últimas diluições foram plaqueadas com três repetições para cada. Em seguida colocadas em estufa a 33°C por 24 horas quando foram contadas as colônias de cada placa e realizado o cálculo para obtenção das UFC/ml (VIEIRA; NAHAS, 2000).

3.5 Manutenção da Colônia de Pulga *Ctenocephalides felis felis*

A colônia de pulgas da espécie *C. felis felis* no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, do Departamento de Parasitologia Animal, do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foi fundada desde 1998, sendo portanto, mantida por infestações artificiais em gatos que foram alojados em gaiolas para manutenção dos insetos adultos até a postura dos ovos, estes gatos receberam diariamente comida e água, e também areia para que sejam realizadas suas necessidades fisiológicas. A infestação foi realizada com pulgas adultas sendo 50% machos e 50% fêmeas, coletadas com sugador adaptado e transferidas para tubos de ensaio com tiras de papel filtro, fechados com TNT e elástico. Em seguida foi feita a infestação no dorso do animal, próximo a cabeça, local de difícil acesso para remoção das pulgas pelo gato no ato de coçar. Para a coleta dos ovos, foi realizada diariamente uma varredura com pincel da areia localizada no fundo removível da gaiola e o produto desta limpeza foi coado para retirada da areia mais grossa. Após coleta e coagem, a areia mais fina foi transferida para potes de plástico que foram selados e colocados em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $75 \pm 10\%$. O desenvolvimento dos adultos ocorreu após 17 dias. Para confirmar a qualidade da infestação e estimar a quantidade de ovos presente, diariamente foi realizada a avaliação do material coletado utilizando microscópio estereoscópico, estimando a média de ovos por campo presente em três porções de areia colocada em placas de Petri. Recentemente a colônia estabelecida neste laboratório passou por processo de queda na produção de ovos para a manutenção da colônia, o que inviabilizou as experimentações por determinado período de tempo. Foi sugerido que esta problemática estivesse relacionada a uma homozigose ocorrida na colônia, sendo, portanto estabelecido que uma nova coleta externa de pulgas fosse necessária para revigorar a colônia. Entretanto isso não foi necessário, pois após determinado período de tempo a colônia foi recuperada.

3.6 Bioensaios

Para os bioensaios foram selecionadas as estirpes NRS 590, NRS1111 de *Br. laterosporus* e NI 176 de *B. thuringiensis*, que apresentaram resultados promissores nos bioensaios realizados por Oliveira (2003). A ativação das culturas das estirpes foi realizada utilizando tubos de ensaio contendo cinco ml do meio Caldo Nutriente (Merck) sob agitação em “shaker” (Agitador Orbital New Brunswick, modelo 25D) a temperatura de 33°C por 18 horas, posteriormente uma alçada de cada amostra foi transferida para tubos contendo cinco ml de meio Ágar Nutriente “slant” em estufa bacteriológica a temperatura de 33°C. A produção de biomassa bacteriana para o bioensaio foi realizada por repiques em dias sucessivos para a obtenção dos diferentes estágios de crescimento (vegetativo com 24h, esporângio com 48h e esporo livre com 72h) de forma que todos fossem retirados no mesmo

dia. Foram feitas as raspagens dos indutos de crescimento bacteriano dos seis tubos de ensaio para cada estágio de desenvolvimento e transferidos para os primeiros tubos de ensaio contendo nove ml da solução salina (0,85%) denominado inóculo original. Deste foram feitas as diluições seriadas, onde um ml do inóculo original foi transferido para o primeiro tubo a 10^{-1} , sendo então um ml do primeiro para o segundo a 10^{-2} e assim sucessivamente para os demais tubos até a 10^{-8} , sendo que todos continham nove ml de salina a 0,85%. Para a contagem de ufc/ml, foram plaqueadas 0,1 ml das três últimas diluições, sendo três repetições de cada diluição, em Ágar Nutriente e colocadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 33°C. Após a contagem do número de colônias por placa foi calculada a média em 0,1ml, a regra de três definiu as concentrações de células em um ml da diluição. Com a obtenção das concentrações foi possível determinar o valor aproximado de ufc/ml nas diluições, quando estas foram multiplicadas pelo fator de diluição. Os experimentos realizados partiram do material concentrado e das diluições. Além desta metodologia, foram realizados bioensaios utilizando estas mesmas amostras liofilizadas a ser descrito posteriormente.

3.7 Bioensaio com *Ctenocephalides felis felis*

A metodologia empregada para a realização do bioensaio teve como base o guia da Associação Mundial para Avanço da Parasitologia Veterinária para testes com fármacos utilizados no controle de pulgas e carrapatos, porém com adaptações (MARCHIONDO et al., 2007) como associação das estirpes descritas anteriormente à dieta para larvas de *C. felis felis*. A dieta foi preparada contendo sangue bovino desidratado em estufa a 100 °C por 24 horas, após este período o sangue foi triturado e a ele foram acrescidos individualmente partes iguais de farelo de trigo e areia lavada na proporção de 1:5 (CORREIA et al., 2003). Para cada teste realizado foram coletadas uma determinada quantidade de ovos de *C. felis felis*, oriundas da colônia de pulgas mantida nas dependências do laboratório supracitado. Os ovos foram contados e acondicionados em tubos de ensaio, com seis repetições de dez ovos para cada tubo contendo a dieta elaborada. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de estiletes e microscópio estereoscópico. Os tubos foram acrescidos de 0,5 g da dieta selecionada, e devidamente vedados com tecidos de náilon (TNT) e elásticos (Figura 1). Os experimentos realizados variaram em volume e concentração, onde cada tratamento foi composto de suspensões bacterianas dos diferentes estágios de crescimento preparadas no dia da coleta dos ovos, em seguida colocados em BOD, sob temperatura e umidade controladas.



Figura 1 Tubos de ensaio contendo 0,5 g da dieta para *Ctenocephalides felis felis* vedados com tecido de náilon (TNT) e elásticos.

3.7.1 Bioensaio com 100ul do induto bacteriano

Para este bioensaio foram coletados 600 ovos de pulgas *C. felis felis* que foram distribuídos em 10 ovos por tudo de ensaio sendo um total de seis repetições para os diferentes estágios (vegetativo, esporângio, esporo livre) testados. Para o grupo controle também foram separados 10 ovos com seis repetições. A todos foram adicionados 0,5g de dieta contendo sangue desidratado, farelo de trigo e areia lavada. Em seguida, após ter sido feita as diluições seriadas das amostras partindo do tubo de inóculo original, foram retirados 100ul deste induto e adicionado nos tubos contendo os ovos e a dieta. Estes tubos foram homogeneizados e posteriormente incubados em câmara climatizada tipo BOD (27 ± 1 °C e $75 \pm 10\%$ U.R) de forma inclinada. Além disso, o grupo controle recebeu o veículo utilizado para a realização das diluições, a salina 0,85%. Após 25 dias, o conteúdo de cada tubo foi fixado em álcool 70% e avaliado com o auxílio de microscópio estereoscópico para a contagem dos adultos de *C. felis felis*.

3.7.2 Bioensaio com 5ul do induto bacteriano

Neste bioensaio foram coletados 600 ovos, também distribuídos como descrito no item anterior. Após a adição da dieta, foram aplicados 5ul do induto bacteriano retirado do inóculo original. O grupo controle recebeu o veículo utilizado para as diluições seriadas, salina 0,85%. Posteriormente estes foram incubados em câmara climatizada tipo BOD (27 ± 1 °C e $75 \pm 10\%$ U.R) de forma inclinada. Após 25 dias, o conteúdo de cada tubo foi fixado em álcool 70% e avaliado com microscópio estereoscópico, para a contagem de adultos.

3.7.3 Bioensaio com amostras liofilizadas

Após a preparação dos liofilizados das amostras NRS 590, NRS 1111 e NI 176, foram coletados 600 ovos e distribuídos como descrito nos itens acima. Em seguida, as ampolas contendo os líofilos das diferentes amostras em diferentes estágios de crescimento (vegetativo, esporângio e esporo livre) foram pesadas e seus volumes divididos em partes iguais, sendo, 50mg distribuídos entre os tubos de ensaio das repetições que já continham as dietas e os ovos. O grupo controle recebeu o pó (“skin milk”) do líófilo sem a presença do microrganismo. Logo após estes tubos foram colocados na posição inclinada dentro de caixas de isopor, onde foi mantida a temperatura ambiente e para manter a umidade foram colocados potes contendo água destilada (Figura 2). Para o controle da umidade e temperatura foi colocado o aparelho Termo-higrômetro digital (INCOTERM-7429). No 30º dia, o conteúdo de cada tubo foi fixado em álcool a 70% e avaliado com microscópio estereoscópico, para a contagem dos adultos.



Figura 2. Caixas de isopor contendo os tubos de ensaio com 0,5 g da dieta selecionada, devidamente vedados com tecidos de náilon (TNT) e elásticos.

3.7.4 Bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado

Para este bioensaio foram coletados 480 ovos distribuídos de acordo com os itens anteriores. Porém para este teste as bactérias NRS 590 e NRS 1111 foram concentradas, reduzindo o volume do solvente (água destilada autoclavada) utilizado para realizar a diluição. Esta modificação foi realizada para diminuir o volume do induto adicionado na dieta das larvas. Em seguida, 50ul foram retirados do tubo de ensaio contendo o inoculo original e adicionado aos tubos que já continham a dieta e os ovos. Foram feitos dois grupos controles sendo um com o veículo sem bactéria e o outro sem nada, apenas a dieta e os ovos. Os mesmo foram então colocados em BOD (27 ± 1 °C e $75 \pm 10\%$ U.R) de forma inclinada. Após 33 dias, o conteúdo de cada tubo foi fixado em álcool 70% e avaliado com microscópio estereoscópico, para a contagem de adultos.

3.7.5 Cálculo da Eficácia

Para o cálculo da eficácia dos tratamentos foi utilizada a fórmula desenvolvida por Abbott (1925):

Eficácia = $[(\% \text{ de emergência do grupo controle} - \% \text{ de emergência do grupo tratado}) / (\% \text{ de emergência do controle})] \times 100$.

3.8 Reisolamento de *Brevibacillus laterosporus* após o Bioensaio com 50ul do Induto Bacteriano Concentrado

A metodologia aplicada nesta técnica foi adaptada de Samson e Evans (1982) utilizada para o isolamento do fungo *Beauveria* a partir de insetos. Portanto, após o 30º dia, período de desenvolvimento até a fase adulta, as larvas secas não pupadas retiradas dos tubos do grupo controle e dos grupos tratados com as suspensões bacterianas, foram transferidas para placas de Petri contendo o meio Ágar seletivo para *Bacillus cereus* (OXOID) acrescido de polimixina B e Ágar nutriente também acrescido de polimixina B, estas foram posteriormente colocadas em estufa bacteriológica sob temperatura de 33°C. Após 48 horas, quando foi possível a visualização de colônias nos meios de cultura com as larvas, estas foram estriadas

para novas placas contendo Ágar nutriente para melhor visualização do isolado ou conferência da pureza e possível identificação de mais de uma colônia presente na mesma larva. Diariamente foi acompanhado o crescimento bacteriano através da preparação de lâminas à fresco com uma alçada da amostra, salina a 0,85%, lâmina e lamínula até quando foi possível a visualização de esporos livres, para a identificação e confirmação de suas características. Após a confirmação da presença de esporos livres, foram feitas lâminas de Gram com uma alçada da amostra, salina 0,85% e lâmina, secagem em bico de Bunsen, para o estudo da morfologia.

3.9 Análise Estatística

Nesta análise foram comparados todos os tratamentos, inclusive o controle, em relação a cada estirpe e posteriormente as estirpes foram comparadas entre si para cada estágio evolutivo da bactéria nos diferentes bioensaios realizados.

Para o estudo estatístico da eficácia entre os grupos tratados e não tratados e entre os diferentes estágios evolutivos da bactéria, devido os resultados obtidos tratarem-se de uma variável discreta e sua avaliação ser de caráter quantitativo foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da amostragem. Em seguida, o número médio de adultos obtidos a partir de cada formulação de tratamento testado foi comparado pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 95% para verificar entre quais tratamentos houve diferença significativa, com níveis de significância menor que 5% ($p < 0.05$) (SAMPAIO, 2002). O programa utilizado para a análise estatística dos dados foi “GraphPad InStat3”.

3.10 Análise Isoenzimática

3.10.1 Crescimento e lise celular

Após 18 horas do crescimento bacteriano a temperatura de 33°C, em estufa bacteriológica, em placas de Petri contendo Ágar Nutriente, o induto foi coletado com alça de platina e transferido para tubo tipo “ependorf” que continha 200ul de tampão de lise (1% Triton x-100, 0.1 M Tampão Tris pH 8, 0,001 M EDTA, 0,001M DTT e 13% ácido E-amino-capróico), e a ele foram adicionados 30mg de pérolas de vidro (0,5mm de diâmetro, SIGMA), sendo então homogeneizado em vórtex por um minuto permitindo assim a lise química e física das células bacterianas. Cada lisado era utilizado no máximo três vezes (ZAHNER, 1992).

3.10.2 Eletroforese de isoenzimas

Os géis foram preparados com uma solução de agarose Tipo V (SIGMA) a 1% em solução de tampão apropriada a cada enzima nas proporções de 1:2, contendo cinco ml de água destilada e 50ml de tampão, vertido sobre um filme GelBond® (AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH AB) em suporte nivelado, onde aguardou-se o tempo para solidificação e em seguida guardados em geladeira. Os géis utilizados foram retirados da geladeira, colocados sobre o suporte nivelado, seco superficialmente com papel filtro, sobre ele foi colocado a fita de aplicação (24 orifícios equidistantes), enquanto isso as amostras foram retiradas do freezer, descongeladas e com uma micropipeta, uma quantidade de 10ul foi aplicado em cada orifício da fita sobre o gel, além disso, houve a aplicação de um corante (34mg de azul de bromofenol, 28mg de xilenocianol, 10ml de água destilada), utilizado como

marcador de corrida, para facilitar a visualização do término da corrida e o controle de velocidade nas extremidades e no meio da fita. Após a secagem do extrato aplicado, a fita foi retirada e o gel levado para a cuba eletroforética horizontal “Multiphor II System” (PHARMACIA BIOTECH), a temperatura constante de 10°C, mantida por um circulador de água refrigerado (MultiTemp III, PHARMACIA BIOTECH). Na cuba foram colocados aproximadamente dois litros do tampão apropriado a cada enzima testada, sendo o mesmo utilizado na preparação do gel. As amostras foram colocadas no catodo e a migração dava-se para o anodo, tendo a maioria das enzimas testadas, sob condições experimentais, a carga negativa. A fonte de energia elétrica utilizada (Techware PS 250 -1 SIGMA) foi mantida em torno de 100 Volts, variando apenas de acordo com o tampão e a concentração do gel.

3.10.3 Revelação das isoenzimas

A revelação das bandas presentes no gel ocorre por técnica histoquímica que é específica para cada enzima, elas baseiam-se nas propriedades catalíticas destas enzimas. Portanto, ao término da corrida eletroforética, o gel foi removido da cuba e imerso na solução de revelação específica segundo Alfenas (1998) e Harris e Hopkinson (1976), onde os componentes da solução reveladora foram: Tampão (Tris- HCl); Substrato; Coenzima (NAD/NADP); MgCl₂ ; Visualizador (MTT, e PMS) e agarose 1% (1g agarose para 100 ml H₂O), em seguida colocado em estufa a 37°C (FANEN, modelo BOD 347 F), porém o tempo de incubação foi determinado através de observações constantes para avaliar o melhor momento de interrupção das reações enzimáticas para visualização das bandas. Esta interrupção foi realizada com a adição de uma solução de ácido acético a 5% (v/v) sobre o gel. Durante o processo de revelação o material que não precipitou foi removido através de seguidas lavagens com a solução descrita acima e posteriormente posto para secar em capela de exaustão, ausente de luz em temperatura ambiente.

Para este trabalho foram testadas 10 enzimas (Tabela 2), com diferentes soluções tampões a fim de se determinar a que seria utilizada na corrida e produção do gel para a eletroforese de isoenzimas (Tabela 3). Porém dentre as enzimas e tampões testados, somente os que apresentaram resultados satisfatórios (Tabela 4), traduzidos por uma boa visualização, bandas bem definidas e constância na revelação foram escolhidas para análise final dos resultados.

Tabela 2 Enzimas testadas na análise isoenzimática das amostras do gênero *Brevibacillus*.

Enzimas	Abreviatura	Código
Aconitase	ACON	E.C.4.2.1.3
Alanina desidrogenase	ADH	E.C.1.4.1.1
Fumarase	FUM	E.C.4.2.1.2
Glutamato desidrogenase	GD2	E.C.1.4.1.4
Fosfoglicose isomerase	GPI	E.C.5.3.1.9
Isocitrato desidrogenase	IDH	E.C.1.1.1.42
Leucina desidrogenase	LDH	E.C.1.4.3.2
Malato desidrogenase	MDH	E.C.1.1.1.37
Enzima málica	ME	E.C.1.1.1.40
Manose -6-fosfato isomerase	MPI	E.C.5.3.1.8

Tabela 3 Soluções tampão utilizadas nos eletrodos e nos géis para a eletroforese de isoenzimas.

Solução Tampão	Componentes	
I- Tampão Fosfato pH 8.0	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O (Sigma)	2,21g
	Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	54,50g
	H ₂ O	2000ml
II- Tampão Tris Maléico pH 7.4	Tris	24,22g
	Na ₂ EDTA (Sigma)	0,74g
	MgCl ₂ (anidro) (Sigma)	0,19g
	Ácido Maléico (Sigma)	10,00g
	H ₂ O	2000ml
III- Tampão Tris Cítrico pH 8.1	Tris (Sigma)	54,00g
	Ácido Cítrico (Sigma)	36,14g
	H ₂ O	2000ml

Tabela 4 Sistema de revelação e tampão utilizado para as enzimas que obtiveram no teste, bom resultado para a análise isoenzimática das estirpes do gênero *Brevibacillus*.

Enzima	Tampão da Reação Tris HCl	H2O (ml)	Substratos 200mg/10ml	Coenzimas 400mg/10ml	Ativadores 4g/10ml	Enzimas de ligação	Método de visualização	Tampão do eletrodo
ACON	4ml pH8.0	-	20mg ácido aconítico	1ml NADP	200ul MgCl ₂	-	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I
ADH	4ml pH8.0	-	100mg alanina	1ml NAD	-	-	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I
FUM	4ml pH8.0	-	25mg ácido fumárico	2ml NAD	-	8ul MDH	2,5ml MTT 2,5ml PMS	I
GPI	4ml pH8.0	1ml	1ml frutose-6-fosfato	1ml NADP	200ul MgCl ₂	10ul G6PDH	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I
IDH	4ml pH8.0	-	2ml ácido isocitríco 1M	1ml NADP	200ul MgCl ₂	-	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I
LDH	4ml pH7.4	-	300mg leucina	3ml NAD	-	-	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I
MDH	4ml pH8.0	-	1ml malato de sódio 1M	2ml NAD	-	-	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I
ME	4ml pH7.4	1ml	1ml malato de sódio 1M	1ml NADP	200ul MgCl ₂	-	2,0ml MTT 1,0ml PMS	I

3.10.4 Tabulação dos dados e análise numérica

Após a secagem em temperatura ambiente o gel foi analisado. Cada banda que foi revelada, eletromorfo, foi numerada em ordem crescente, sendo que a banda um era a mais próxima da origem (catodo), a posterior recebia o número dois e assim sucessivamente. Em seguida a padronização, as estirpes que apresentavam uma determinada banda em uma enzima específica foram utilizadas para confirmar ou determinar o perfil de outras estirpes. Cada banda presente no gel foi tabulada e os dados foram processados no programa NTSYS-PC versão 2.01 (Applied Biostatistics Inc.). As análises dos dados foram feitas a partir desta matriz binária, utilizando-se coeficientes de similaridade, como o de concordância simples e coeficiente de Jaccard, que geraram fenogramas pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA- “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”). Através do programa NTSYS-PC já citado anteriormente, foi possível determinar se os fenogramas resultantes eram realmente representativos da matriz de semelhança, com a aplicação do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), onde aquele que apresentou o maior valor de “r” ≥ 0.9 , foi considerado o que representou melhor as relações entre as estirpes testadas.

3.11 Amplificação do DNA por PCR-BREV

O DNA foi amplificado com os primers BREV174F 5' AGACCGGGATAACATAGGGAAA 3' e 1377R 5' GGCATGCTGATCCGCGATTA 3' para confirmação da espécie. Para a reação descrita por Shida et al. (1996), foram utilizados cinco μ l do DNA dosado de cada amostra, que corresponde a 25ng de DNA. Como controle positivo da PCR foi utilizada amostra de *Br. brevis* e um controle negativo da reação sem DNA. Cada tubo de reação continha um volume final de 25 μ l, contendo cinco μ l do DNA, 2,5 μ l da solução tampão 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3 – Invitrogen), 200 μ M de cada deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs – Promega), 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), um pmol de primer, uma unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura para PCR. Os ciclos de amplificação consistiram em 25 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 58°C por um minuto e meio e extensão a 72°C por um minuto e meio e com um ciclo de extensão final a 72°C por cinco minutos. A Reação da PCR foi realizada em termociclador GeneAmp 9600 da Perkin-Elmer (Cetus – MA). Foram aplicados 10 μ l de cada produto amplificado em gel de agarose ultrapura (Invitrogen) na concentração de 1.2% em TBE 1X a 100V por duas horas. Como marcador molecular foi utilizado um Kb DNA “ladder”(Invitrogen). Ao fim da corrida o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) por 15 min, descorado por 20 min e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado em sistema de fotodocumentação (EasyDoc 100 da BioAgency), com câmera digital Canon S10 acoplada a um computador.

3.12 Técnica de RAPD-PCR

3.12.1 Isolamento, purificação e quantificação do DNA

O processo de extração do DNA genômico foi seguido de acordo com o protocolo do kit comercial GeomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Bioscience – GE Healthcare) disponibilizado pelo fabricante com modificações. Para a realização da lise celular uma alçada foi retirada do crescimento bacteriano em estufa “overnight” a 33°C e colocado em tubos “eppendorf” de 1,5ml contendo 600 μ l de tampão TE (10mM Tris, 1M EDTA), a 1%, pH 8.0, mantido resfriado em gelo, homogeneizado em “vortex” e centrifugado a 14.000 rpm por um minuto, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, 600 μ l da solução de lise celular (Cell Lysis Solution) foram adicionados e homogeneizados em “vortex”. Antes de

entrar no banho-maria (Multi-Blok Heater, Lab-Line Instruments) a 37°C por 15 min, foi adicionado três μ l de lisozima (100mg/ml), após este tempo foi retirado e novamente colocado em banho-maria a 80°C por 15 min e resfriado a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 30 μ l de solução de Proteinase K (20 mg/ml), permanecendo incubado em banho-maria a 55°C por 30 min. Após a incubação o lisado foi deixado à temperatura ambiente por dez minutos para o seu resfriamento e em seguida foi submetido ao tratamento com três μ l de solução de RNase A (4 μ g/ μ l), misturando a amostra invertendo o tubo algumas vezes seguido de incubação a 37°C por uma hora. O lisado foi resfriado por cinco minutos à temperatura ambiente e em seguida foi acrescentado 200 μ l de solução de precipitação de proteínas (Protein Precipitation Solution) e agitou-se vigorosamente com o auxílio do “vortex” por 20 segundos. Após esta etapa, os lisados foram centrifugados a 14000 rpm em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf) por três minutos e com a utilização de pipeta o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5ml e então foi adicionado 600 μ l de isopropanol 100%, com inversão por aproximadamente 50 vezes até a visualização da formação de um fio branco de DNA. Nesta etapa o DNA foi submetido a uma centrifugação de 14000 rpm por um minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e os tubos foram deixados invertidos sobre o papel filtro para a secagem do DNA à temperatura ambiente. Adicionou-se 600 μ l de etanol 70% gelado e inverteram-se os tubos várias vezes para a lavagem do “pellet” de DNA e em seguida foi feita a centrifugação a 14000 rpm por um minuto. O etanol foi removido e os tubos foram deixados em estufa a 37°C sobre o papel filtro para a secagem do “pellet”. Para a hidratação do DNA ressuspendeu-se o “pellet” com 100 μ l de solução de hidratação (DNA Hydration Solution) e deixou à temperatura ambiente “overnight”. No dia seguinte foi estocado a 4°C.

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (GeneQuant® Amersham Pharmacia) usando-se diluições 1:10 em H₂O MilliQ. A pureza foi estimada pela razão entre os valores de densidade ótica obtidos a 260 e 280nm. A pureza do DNA foi avaliada após corrida eletroforética de um μ l do DNA extraído em gel de agarose a 1% (p/v), a 100V por uma hora e 30 minutos.

Os DNAs extraídos foram então diluídos e aliquotados a um volume final de 25 ng/5 μ l.

3.12.2 Amplificação do DNA por PCR- RAPD

Para a observação do polimorfismo existente nos DNA analisados, foram utilizados os primers OPA 11 – 5’ CAATCGCCGT 3’, OPA 02 – 5’ TGCCGAGCTG 3’ e OPA 04 – 5’ AATCGGGCTG 3’ todos Operon Technologies, Alameda, CA, USA. Para a reação descrita por Zahner et al., (1999), foram utilizados cinco μ l do DNA dosado de cada amostra, que corresponde a 25ng de DNA. Como controles de PCR positiva e negativa foram utilizadas amostras com perfil já descrito por Zahner et al. (1999) e um controle negativo da reação sem DNA. Cada tubo de reação continha um volume final de 25 μ l, contendo cinco μ l do DNA, solução tampão 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3 – Invitrogen), 100 μ M de cada deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs – Promega), 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), cinco pmol de primer, uma unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura para PCR. Os ciclos de amplificação consistiram em um passo inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 36°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos e com um ciclo de extensão final a 72°C por dois minutos. A Reação PCR foi realizada em termociclador GeneAmp 9600 da Perkin-Elmer (Cetus – MA). Foram aplicados dez μ l de cada produto amplificado de todos os primers em gel de agarose ultrapura (Invitrogen) na concentração de 1.5% em TBE 1X a 100V por duas horas. Como marcador molecular foi utilizado um mix de λ DNA Hind III e Φ X 174RF DNA Hae

III (Invitrogen). Ao fim da corrida o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 15 min, descorado por 20 min e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado em sistema de fotodocumentação (EasyDoc 100 da BioAgency), câmera digital Canon S10 acoplada a um computador.

3.13 Caracterização do Perfil Plasmidial dos Isolados

3.13.1 Extração do DNA plasmidial manual e por “Kits”

A extração do conteúdo plasmidial das 37 estirpes foi realizada por “steps” manuais descritos por Battisti et al. (1985) com adaptações. O crescimento celular se deu em “Erlenmeyers” de 250ml, contendo 25ml do meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO), incubado sob agitação de 160 rpm por 16 horas a 35°C em shaker (Agitador Orbital New Brunswick, modelo 25D). Após, a biomassa produzida foi transferida para tubos de polipropileno de 50 ml e realizada a centrifugação a 10.000 rpm (Centrífuga Sorvall rotor SS34) por dez minutos a 15°C. A etapa de ressuspensão foi realizada em um ml do Tampão E (0.04M Tris; 0.002M EDTA; 15% Sacarose, pH 7,9) e gentilmente agitada em “vortex”. A etapa seguinte a lise das células ocorreu com a adição de dois ml do Tampão de lise (3g de SDS; 5ml de 3N NaOH; 15% (p/v) Sacarose; 0.05M Tris-HCl, volume total de 100ml) a um ml da suspensão anterior, em seguida foram invertidos rapidamente por 20 vezes (para misturar células ao tampão) e incubados em banho-maria (Multi-Blok Heater, Lab-Line Instruments) a 60°C por 30 min. Após foi adicionado 0.5 ml de pronase (solução de 2mg/ml em 2M Tris, pH 7.0), misturados novamente por inversão e incubados em banho-maria por 20 min a 37°C. A extração do lisado foi feita pela adição de seis ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1:1, vol/vol) e pela inversão por 40 vezes, que produziu uma emulsão que foi centrifugada sucessivas vezes a 10.000 rpm por 10 min a 15 °C, onde podem ser observados três fases: a 1ª fase de cima para baixo é o DNA, a 2ª fase proteínas e a última o clorofórmio/álcool isoamílico. Cuidadosamente com a utilização de pipeta foi retirada a 1ª fase contendo o DNA, transferido para um novo tubo de polipropileno para efetiva separação da fase aquosa a ser removida e aplicada em gel de agarose para verificação da extração por eletroforese.

Além desta técnica descrita acima, foram realizadas extrações de plasmídios a partir de quatro kits comerciais (PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit – Invitrogen; Plasmid DNA Purification – Macherey-Nagel; High Pure Plasmid Isolation Kit – Roche; GeneJet Plasmid Miniprep Kit – Fermentas) que em sua maioria consistem nas seguintes etapas: ressuspensão, lise, precipitação, lavagem (purificação) e eluição de acordo com cada fabricante.

3.13.2 Eletroforese convencional

Para a análise do perfil plasmidial gerado por estas extrações são essenciais o peso molecular e comparação entre estirpes, portanto foram aplicadas em gel cinco µl do produto extraído por “steps” manuais e “Kits” com dois µl do corante (0.02 g azul de bromofenol, 0.02 gr xilenocianol, 2.5 gr ficoll 400, 10ml TBE 5X) e submetidas a corridas eletroforéticas com diferentes concentrações de 0.5%, 0.7% e 0.8% do gel de agarose ultrapura (Invitrogen), do TBE 0.5X e 1X (0.89M Trizma-Base; 0.89M Ácido Bórico e 0.24M EDTA Na₂, pH8.3), da voltagem de 60V, 70V e 100V além dos tempos de corrida de 2h, 3h e 4h para definir o melhor ajuste. Foram utilizados como marcadores moleculares um mix de λ DNA Hind III e ΦX 174RF DNA Hae III (Invitrogen). Após a eletroforese o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 15 min, descorado por 20 min e visualizado em transiluminador de luz

ultravioleta (UV) e fotografado em sistema de fotodocumentação (EasyDoc 100 da BioAgency), com câmera digital Canon S10 acoplada a um computador.

3.13.3 Extração do DNA plasmidial a partir de “plugs” de agarose

Para a confecção dos “plugs” utilizados no PFGE as amostras foram crescidas em meio Ágar Nutriente, “overnight” em estufa bacteriológica a 33°C. A massa coletada foi transferida para tubo “eppendorf” de 1.5ml, ressuspensa em um ml da solução EET (100mM EDTA, 10mM EGTA, 10mM Tris/HCl pH 8.0) e agitada em “vortex”. Em seguida as células foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf) a 13.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante gerado foi descartado. Este processo foi repetido três vezes, sendo que na última ressuspensão não foi feita centrifugação e deste foram retirados 150ul e transferidos para um novo tubo de microcentrífuga limpo, a este foi adicionado 300ul de agarose 1% INCERT (FMC), aquecida a 40°C e misturada usando a própria ponteira de adição. Logo em seguida, 50ul desta solução anterior foram rapidamente colocadas em moldes de confecção de “plugs” (BioRad). Após 15 min, os incertos foram transferidos para um tubo de polipropileno de 15ml e foram adicionados a eles dois ml da solução tampão de lise (6mM Tris/HCl pH 7.5, 100mM EDTA pH 7.5, 1M NaCl, 0.2% Deoxycholate, 0.5% Sarcosyl, 0.5% Brij 58, 1mg/ml lizozima, 20ug/ml RNase) e incubados a 37°C por 18 horas. O tampão de lise da fase anterior foi retirado e foram adicionados dois ml de tampão ESP (900ul de 0.5M EDTA pH 8.0, 1% (p/v) SDS, 1mg Proteinase K) e incubados por 48 horas a 50°C. Após este período o tampão anterior foi removido e foram adicionados 20ml de tampão TE (1mM EDTA, 10mM Tris/HCl pH 7.5) mais um mM de PMSF (17mg PMSF, 100ml TE). A incubação foi realizada por 24 horas a temperatura ambiente. Este foi removido e por mais três vezes esta etapa foi repetida, sendo que na última foram adicionados dez ml do tampão TE e estocados a 4°C (ZAHNER, 1998; ZAHNER et al., 1999).

3.13.4 Corrida eletroforética em PFGE

A fim de se buscar plasmídeos de peso molecular maior foi utilizada a técnica “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE). Esta compreende a incorporação de células bacterianas em blocos de agarose, em seguida lise e utilização em corrida eletroforética com pulsos e intensidades periodicamente alternados para separação dos fragmentos de DNA com tamanhos grandes entre 1Kb a 12MB. Para a corrida eletroforética no aparelho CHEF DRII (BioRad) foi preparado um gel de agarose (SIGMA Tipo II médio EEO) 1% em TBE 0.5X. Após solidificado foram colocados os “plugs” cortados dentro de cada poço formado pelo pente e em seguida selado com agarose 1%, depois de solidificado foi colocado na máquina de PFGE, onde o tampão de corrida TBE 0.5X já havia sido colocado para que fosse ajustado a temperatura de 10°C. Após o gel ser colocado na cuba, foram ajustados os seguintes parâmetros de corrida segundo Pannucci et al. (2002): 175 V, por 21 horas com “ramp” inicial de 5 seg. e final de 40 seg. Terminado a corrida o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 15 min, descorado por 20 min e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado em sistema de fotodocumentação (EasyDoc 100 da BioAgency), câmera digital Canon S10 acoplada a um computador.

4 RESULTADOS

4.1 Bioensaio com Induto Bacteriano na Formulação Líquida

4.1.1 Bioensaio com 100ul do induto bacteriano

O número de adultos emergidos de *C. felis felis* após 25 dias do tratamento com 100ul do induto de crescimento das cepas NRS1111, NRS590, NI176 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia podem ser visualizados na Tabela 5. Neste bioensaio foi observado que após a adição da formulação líquida, a dieta composta de sangue desidratado, farelo de trigo e areia ficou aderida no fundo do tubo de ensaio, por excesso de umidade e também foi possível detectar a presença de fungos crescendo principalmente no farelo presente na mistura da dieta em todos os tratamentos, incluindo o grupo controle que obteve um número elevado de emergência dos adultos. Apesar destes fatos relatados acima, para a maioria das pulgas houve o desenvolvimento completo, porém dentro de alguns tubos de ensaio foi possível a visualização de pupas formadas com pulgas em seu interior. Estas pulgas ainda pupadas encontradas foram estimuladas a sair pela ruptura do envoltório. Neste caso as pulgas que não apresentaram nem um tipo de movimentação e coloração esbranquiçada foram consideradas mortas, quando apresentaram movimentação e coloração acastanhada foram determinadas como vivas e contadas para efeito do cálculo da eficácia. De acordo com os dados mostrados na tabela 5, foi possível dizer que houve diferença significativa na emergência de adultos entre o grupo controle e os tratamentos com as diferentes cepas. A determinação deste ocorreu pela não visualização de adultos vivos na maioria dos tubos de ensaio que foram tratados com as suspensões bacterianas, e também pela presença de algumas larvas secas. Já entre as diferentes estirpes testadas em diferentes estágios evolutivos o número de indivíduos vivos, não foi significativo para que nos pudéssemos afirmar o estágio que apresentou maior potencial patogênico e qual estirpe foi mais eficaz no controle biológico de pulgas.

Tabela 5. Número de adultos emergidos de *Ctenocephalides felis felis* após 25 dias do tratamento com 100ul do induto de crescimento das cepas cepas NRS 1111, NI 176 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.

Grupo/ Repetições	Controle	NRS 1111 (vegetativo)	NRS 1111 (esporângio)	NRS1111 (esporo livre)	NRS 590 (vegetativo)	NRS 590 (esporângio)	NRS 590 (esporo livre)	NI 176 (vegetativo)	NI 176 (esporângio)	NI 176 (esporo livre)
1	9	0	2	0	0	0	0	0	2	1
2	10	0	0	4	1	1	2	3	5	0
3	7	0	0	2	3	1	0	0	0	0
4	9	2	0	0	2	0	1	1	0	1
5	10	0	2	5	1	1	0	3	0	1
6	10	0	2	1	0	1	1	2	2	1
Total	55	2	6	12	7	4	4	9	9	4
Média/dp	9,1±1,16^a	0,3±0,81^b	1±1,09^b	2±2,09^b	1,1±1,16^b	0,6±0,51^b	0,6±0,81^b	1,5±1,37^b	1,5±1,97^b	0,6±0,51^b
Eficácia %	-	96,7%	89,0%	78,0%	87,9%	93,4%	93,4%	83,5%	83,5%	93,4%

^{ab} Linha com médias com a mesma letra não diferem significativamente (p>0,05). Dp- desvio padrão.

4.1.2 Bioensaio com 5ul do induto bacteriano

No bioensaio com adição de 5ul do inóculo original na dieta oferecida as larvas de pulga, foi possível observar que a dieta não ficou aderida no fundo do tubo de ensaio, o que motivou a redução do volume de induto bacteriano utilizado, contudo, seguindo sempre as mesmas condições de experimentação, foi verificado que o grupo controle contendo apenas o veículo não obteve boa emergência de adultos. Neste experimento notou-se que havia um grande número de larvas secas no final do tempo necessário ao desenvolvimento até o estágio de adulto, em todos os tubos de ensaios. Além disso, também foi observado a presença de alguns ovos que pareciam não ter eclodido, porém em avaliações realizadas durante a experimentação sob microscópio óptico a presença das larvas era constante e estavam bem desenvolvidas, contudo, não apresentavam o sistema digestório repleto de sangue digerido (coloração acastanhada), nós supomos com isso que ela estava se alimentando apenas do farelo que compõem a dieta. A presença de larvas bem desenvolvidas e posteriormente secas após o tempo de 30 dias levou-nos a crer que não houve a passagem da larva para o estágio de pupa, por isso o pouco número de adultos emergidos presentes. Portanto de acordo com os dados apresentados na Tabela 6, como o baixo número de adultos emergidos no grupo controle e nos tratados a ação patogênica das estirpes testadas ficou distorcida, apenas nos despertou a atenção para um possível problema externo ao bioensaio em si, tais como: manuseio dos ovos, problemas na manutenção da colônia, fatores abióticos (temperatura e umidade). A partir deste resultado foi possível afirmar que não houve diferença significativa entre as estirpes testadas e nem entre os estágios de desenvolvimento bacteriano.

Tabela 6. Número de adultos emergidos de *Ctenocephalides felis felis* após 25 dias do tratamento com 5ul do induto de crescimento das cepas NRS 1111, NRS 590 e NI 176 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.

Grupo/ Repetições	Controle	NRS 1111 (vegetativa)	NRS 1111 (esporângio)	NRS 1111 (esporo livre)	NRS 590 (vegetativa)	NRS 590 (esporângio)	NRS 590 (esporo livre)	NI 176 (vegetativa)	NI 176 (esporângio)	NI 176 (esporo livre)
1	3	2	5	6	3	8	10	8	8	5
2	3	5	6	9	9	8	6	8	5	8
3	2	4	9	7	7	9	8	8	3	6
4	9	4	5	8	8	5	8	9	4	8
5	9	4	7	6	3	8	6	3	3	6
6	5	8	6	9	3	9	6	3	4	10
Total	31	27	38	45	33	47	44	39	27	43
Média/dp	5,1±3,12^a	4,5±1,97^a	6,3±1,50^a	7,5±1,37^a	5,5±2,81^a	7,8±1,47^a	7,3±1,63^a	6,5±2,73^a	4,5±1,87^a	7,1±1,83^a
Eficácia %	-	11,7%	-23,5%	-47%	-7,8%	-52,9%	-43,1%	-27,4%	11,7%	-39,2%

^a Linha com médias com a mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$). Dp- desvio padrão.

4.2 Bioensaio com Estirpes Bacterianas Liofilizadas

Os resultados obtidos neste bioensaio podem ser observados na Tabela 7, onde verificamos que não houve diferença significativa na emergência de adultos perante as cepas testadas e entre os estágios de desenvolvimento. A utilização das cepas liofilizadas teve como idéia central a diminuição da umidade gerada pelo induto liquido aplicado nos bioensaios anteriores, porém quando este foi colocado em BOD foi observado que por ser altamente higroscópico o liofilo absorveu muita umidade do ambiente e a dieta tornou-se úmida novamente. Neste bioensaio observamos uma baixa emergência de adultos no grupo controle com “Skin Milk”. Ao realizarmos um bioensaio apenas com o veículo deste experimento e outro grupo controle sem nenhum tipo de tratamento, verificamos que os dois grupos apresentaram baixa emergência, o que nos mostrou que o veículo “Skin Milk” não interferiu no desenvolvimento das pulgas. A solução encontrada para esta problemática foi a utilização de caixas de isopor onde a umidade seria menor e conseqüentemente a dieta não ficaria novamente colada. Em uma das avaliações que foi realizada após 16 dias de experimentação em caixas de isopor, foi possível observar a presença das larvas bem desenvolvidas, porém não apresentavam o intestino repleto de sangue. Após 26 dias de experimentação foi possível observar o primeiro tudo de ensaio com uma pulga adulta, o restante ainda estava no estágio de larva. Devido a este fato a avaliação final onde foram feitas as contagens dos números de adultos presentes só foram realizadas após 45 dias de experimentação, quando foi observado pelo menos um adulto em cada tubo de ensaio. Apesar de terem sido encontrados adultos emergidos neste bioensaio, ainda sim o grupo controle apresentou-se com baixa emergência, o que nos permite afirmar que não houve diferença significativa para a avaliação do perfil patogênico apresentado pelas estirpes em teste. Desta forma não podemos afirmar que esta forma de tratamento não foi eficaz uma vez que a problemática da emergência dos adultos e da não alimentação das larvas já vem se repetindo em vários dos nossos experimentos.

Tabela 7 Números de adultos emergidos de *Ctenocephalides felis felis* após 25 dias do tratamento com as cepas NRS 1111, NRS 590 e NI 176 liofilizadas nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.

Grupo/ Repetições	Controle	NRS1111 (vegetativa)	NRS 1111 (esporângio)	NRS 1111 (esporo livre)	NRS590 (vegetativa)	NRS 590 (esporângio)	NRS 590 (esporo livre)	NI 176 (vegetativa)	NI 176 (esporângio)	NI 176 (esporo livre)
1	8	6	4	2	2	3	2	4	3	3
2	3	3	2	2	7	1	2	4	7	5
3	2	5	2	0	5	1	0	2	3	0
4	3	4	3	5	5	4	5	3	5	3
5	3	4	2	0	3	6	4	5	3	4
6	4	4	5	3	2	3	7	3	4	2
Total	23	26	18	12	24	18	20	21	25	17
Média/dp	3,8±2,13^a	4,3±1,03^a	3±1,26^a	2±1,89^a	4±2,00^a	3±1,89^a	3,3±2,50^a	3,5±1,04^a	4,1±1,60^a	2,8±1,72^a
Eficácia %	-	-13,1%	21%	47,3%	-5,2%	21%	13,1%	7,8%	-7,8%	26,3%

^a Linha com médias

com a mesma letra não diferem significativamente (p>0,05). Dp- desvio padrão.

4.3 Bioensaio com 50ul do Induto Bacteriano Concentrado

Neste bioensaio utilizamos o mesmo número de células do primeiro bioensaio, mantendo assim o potencial patogênico, mas com um volume reduzido para evitar a umidade da dieta e conseqüentemente que ela ficasse colada no fundo do tubo, para que alguns fatores considerados interferentes nos outros bioensaios realizados fossem evitados. Nos primeiros 5 dias de experimentação os tubos controles que continham apenas os ovos e a dieta apresentavam larvas alimentadas (intestino repleto de sangue), contudo, nos demais onde foram adicionadas as suspensões as larvas não estavam alimentadas (esbranquiçadas). Já passados 27 dias de experimentação, os tubos controles apresentaram larvas e pupas e nos tubos de ensaio com os diferentes tratamentos não foi possível visualizar as larvas e a dieta estava colada no fundo do tubo. Após 33 dias ainda foi possível a visualização de larvas sendo, portanto que em sua grande maioria já se encontravam secas, outras muito desenvolvidas com pouca movimentação e presença de poucas pupas. Os resultados obtidos neste bioensaio podem ser observados na Tabela 8, onde verificamos que não houve diferença significativa na emergência dos adultos de pulgas entre as duas cepas testadas e entre os estágios de desenvolvimento apesar do elevado percentual de eficácia verificado. Este percentual elevado ficou a cargo de não termos encontrado muitos adultos presentes nesta experimentação. Este bioensaio também demonstrou uma baixa emergência de adultos nos dois grupos controle. Porém, a presença de adultos ficou restrita aos tubos dos grupos controle sem veículo e grupo tratado com a estirpe NRS 1111 nos estágios de vegetativo e esporângio apenas.

Tabela 8 Números de adultos emergidos de *Ctenocephalides felis felis* após 35 dias do tratamento com 50ul do induto de crescimento bacteriano concentrado das cepas NRS 1111 e NRS 590 nos diferentes estágios de desenvolvimento e sua eficácia.

Grupo/ Repetições	Controle Sem veículo	Controle Com veículo	NRS1111 (vegetativa)	NRS 1111 (esporângio)	NRS 1111 (esporo livre)	NRS590 (vegetativa)	NRS 590 (esporângio)	NRS 590 (esporo livre)
1	0	0	0	1	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0
3	7	0	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	10	0	1	1	0	0	0	0
Média/dp	1,6±2,73^a	0±0^a	0,16±0,4^a	0,16±0,4^a	0±0^a	0±0^a	0±0^a	0±0^a
Eficácia %	-	-	90%	90%	100%	100%	100%	100%

^a Linha com médias com a mesma letra não diferem significativamente (p>0,05).

Dp- desvio padrão.

4.4 Reisolamento Bacteriano

O reisolamento bacteriano foi realizado apenas no último bioensaio realizado (bioensaio com 50ul do induto bacteriano) para confirmar se as larvas realmente estavam se alimentando também com as bactérias as quais foram expostas, pois em alguns dos grupos tratados após 35 dias de experimento apenas encontramos indivíduos no estágio larval e estas estavam secas

As amostras apresentaram desenvolvimento de algumas colônias após 48 horas em estufa bacteriológica a 33°C (Figuras 4, 5). Para comparação, as cepas originais provindas do estoque de *Br. laterosporus* também foram plaqueadas e foi possível visualizar que elas são capazes de formar colônias com coloração azul-esverdeada, característica comum para estirpes do grupo *B. cereus* (Figuras 3). As diferentes colônias que cresceram a partir das larvas foram estriadas em novas placas de Ágar Cromogênico e Ágar Nutriente para efeito de isolamento o que também permitiu a preparação de laminas à fresco para observação da morfologia e confirmação da presença de esporos livres, o que ocorreu em algumas amostras após 72 horas (Figura 6). A coloração de Gram foi realizada após a visualização de esporos livres para todas as colônias encontradas, isto permitiu a verificação da presença das estirpes de *Br. laterosporus* e sua ingestão pela larva. Como esperado no grupo controle que apresentou colônias diferenciadas dos grupos tratados, através da coloração de Gram não foi possível a identificação de *Br laterosporus*.



Figura 3 Crescimento microbiano a partir da amostra original das estirpes NRS 1111 e NRS590 de *Br laterosporus* retiradas do estoque e plaqueada por estriamento em Ágar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN) com 3mg de Polimixina B, após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C.

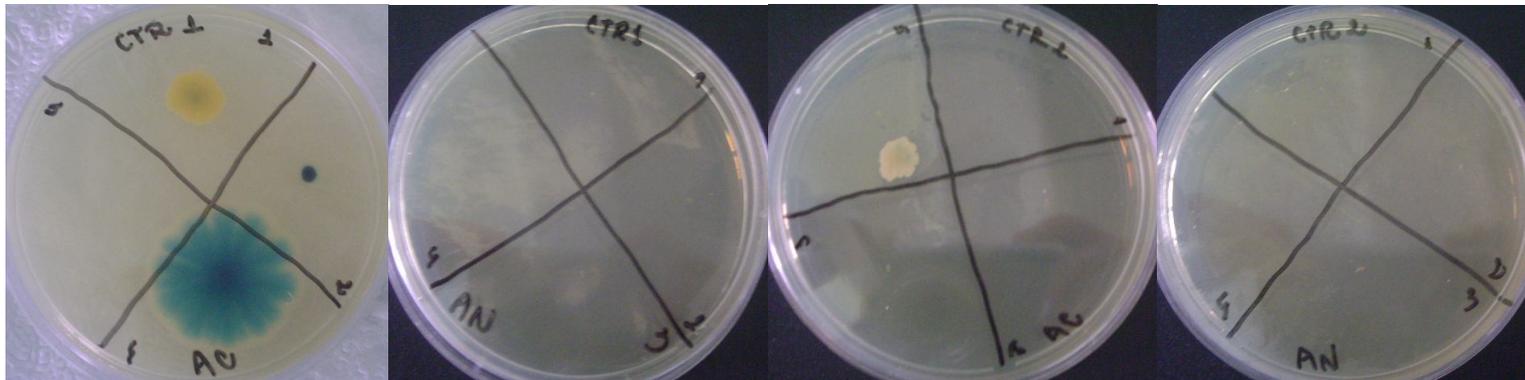


Figura 4. Crescimento microbiano a partir de 4 larvas (1,2,3,4) retiradas do grupo controle 1 (com veículo) e 2 (sem veículo) em placas de Petri contendo meio Ágar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN) com 3mg de Polimixina B após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C. Este reisolamento ocorreu após o trigésimo quinto dia de experimentação do bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado.

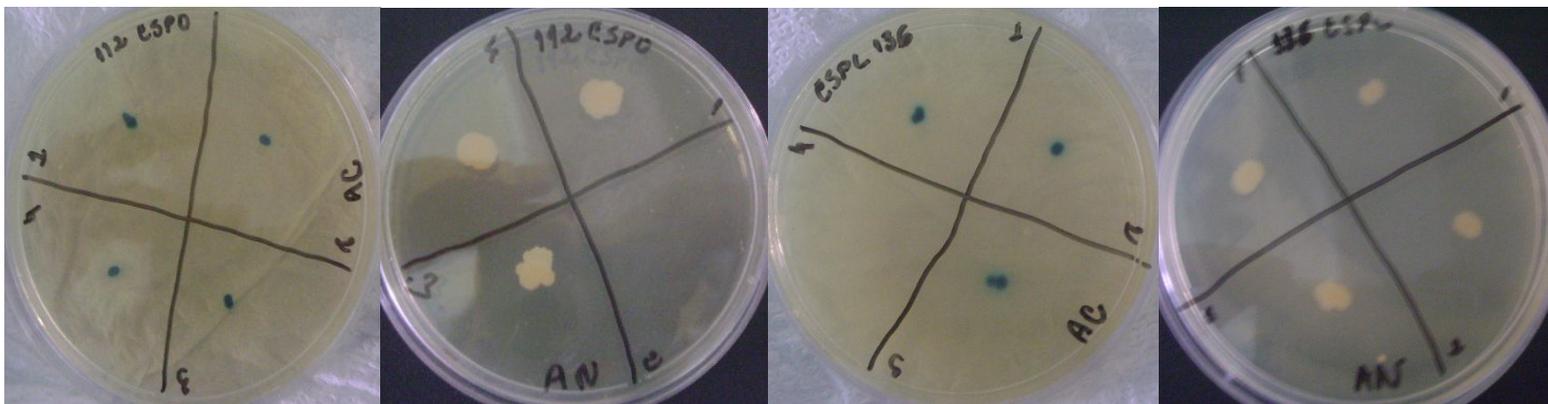


Figura 5. Crescimento microbiano a partir de quatro larvas (1,2,3,4) retiradas do grupos tratados com as estirpes NRS1111 (112) e NRS590 (136) nos diferentes estágios de esporângio (ESPO) e esporo livre (ESPL) em placas de Petri contendo meio Ágar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN) com 3mg de Polimixina B após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C. Este reisolamento ocorreu após o trigésimo quinto dia de experimentação do bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado.



Figura 6. Crescimento microbiano, por estriamento, que partiu de uma alçada coletada de cada colônia presente nos crescimentos a partir das larvas (L1, L2, L3 e L4) retiradas dos grupos tratados com as estirpes NRS1111 (112) e NRS590 (136) nos diferentes estágios de esporângio (ESPO) e esporo livre (ESPL) em placas de Petri contendo meio Ágar Cromogênico para *Bacillus cereus* (AC) e Agar Nutriente (AN), após 48h de crescimento em estufa bacteriológica a 33°C. Este reisolamento ocorreu após o trigésimo quinto dia de experimentação do bioensaio com 50ul do induto bacteriano concentrado.

4.5 Tipagem Molecular

4.5.1 Análise isoenzimática

Foram analisadas por eletroforese de isoenzimas 34 estirpes do gênero *Brevibacillus*, sendo dois *Br brevis*, um *Br agri* e 31 estirpes de *Br laterosporus*. Das dez enzimas utilizadas neste estudo (ACON, ADH, FUM, GD2, GPI, IDH, LDH, MDH, ME, MPI), apenas cinco (FUM, GD2, IDH, LDH, MPI) não foram testadas anteriormente para o grupo *Brevibacillus*. Destas cinco novas enzimas testadas, foram encontrados bons resultados apenas com três (FUM, IDH e LDH). Com as enzimas GD2 e MPI não foi possível obter resultado satisfatório.

Na tabela 9, nenhuma enzima testada foi monomórfica, contudo, foi possível obter 24 “zymovares” ou Tipos Eletroforéticos que não separaram as estirpes patogênicas de não patogênicas. Apenas foi possível observar que estirpes com alto potencial patogênico ficaram agrupadas no “zymovar” 5, porém não ficaram restritas a este tipo eletroforético, pois foram distribuídas em outros zymovares como a cepa NRS 1111 que pertence ao tipo eletroforético 12.

Após a análise da similaridade com os coeficientes: Simple Matching e Jaccard foi aplicado o CCC para verificação da melhor congruência entre o dendrograma e a matriz original. O maior “r” (0.924 e 0.956) obtido foi aquele apresentado pelo Coeficiente de Jaccard (Figuras 7 e 8). Através do algoritmo UPGMA, a análise de similaridade dividiu as estirpes dentro de três maiores “Clusters”, grupo clonal A e B com 65% de similaridade e o grupo clonal C com 62% de similaridade, entretanto B ainda foi dividido em três subgrupos B1 e B2 com 72% de similaridade e B3 com 67% de similaridade (Figura 7). No dendrograma baseado no S_j (Figura 7) as cepas de *Br. laterosporus* em sua maioria apresentaram 82% de similaridade, enquanto que a estirpe LFB052 de *Br brevis* apresentou 33% de similaridade. Já a estirpe Ad 647 de *Br agri* apresentou 37% de similaridade. Este fato demonstrou um baixo polimorfismo intraespecífico em *Br. laterosporus*. Além disso, demonstrou que *Br. laterosporus* e *Br. agri* são espécies distintas.

No “cluster” A as estirpes CCEB 342, Shi 2, NRS 1267 apresentaram 100% de similaridades. No “cluster” B no grupo clonal B2 ainda foi possível observar a presença de dois subgrupos B2.1 e B2.2, onde a maioria das cepas apresentou 100% de similaridade. As cepas NRS 661, NRS 1645, NRS 1647, ATCC 64, NRS 1883 e NRS 590 pertencentes ao subgrupo B2.1 e BON 712, NRS 1111 e NRS 1247, pertencentes ao subgrupo B2.2. Ainda dentro do “cluster” B foram distribuídas as estirpes que apresentaram maior potencial de patogenicidade, e as demais com menor potencial ficaram distribuídas entre os demais “clusters” A e C (Figura 7).

As estirpes Ad 681 e Ad 439 que foram recebidas em nosso laboratório como cepas de *Br agri*, apresentaram um perfil similar as cepas de *Br laterosporus* com 76% e 85% respectivamente, sendo portanto encontradas entre os grupos clonais A e B. Isto promoveu a dúvida quanto a caracterização destas cepas, pois de acordo com este mesmo dendrograma a cepa Ad 647 considerada *Br agri*, apresentou uma similaridade baixa de 36% para com as estirpes do grupo *Br laterosporus*.

Os zymovares 3, 10, 19, 20, 21 e 23, fazem parte dos agrupamentos maiores, com baixa similaridade com as demais estirpes analisadas (Tabela 9).

A análise fenética que utilizou o coeficiente de concordância simples e o algoritmo UPGMA demonstrou a presença de quatro maiores “clusters” (A, B, C, D) (Figura 8). No cluster A estão presentes as mesmas estirpes encontradas no fenograma que utilizou o coeficiente de Jaccard, porém o percentual de similaridade foi de 85% tanto para os “clusters” A quanto B. Já o C apresentou 83% de similaridade e o D 79%. O cluster B foi dividido em

grupo clonal B1 e B2 cujas amostras são NRS 1646 e NRS661, NRS1645, NRS1647, ATCC64, NRS1883, NRS590, BON712, NRS1111, NRS1247, Ad439, SHI1, NRS1264, NRS1338 respectivamente. Porém em discordância do outro coeficiente aplicado o “cluster” B não apresentou o grupo clonal B3 onde haviam sido colocadas as amostras NRS1642 e NRS1648 como foi demonstrado pela figura 8. Estas amostras pelo coeficiente de concordância simples ficaram dentro do “cluster” D apresentando 90% de similaridade com as demais estirpes de *Br. laterosporus* usadas nesta análise. Dentro do cluster C, foi possível visualizar as mesmas estirpes (SHI4 e SHI3) presentes no cluster C do fenograma gerado pelo coeficiente de Jaccard. Com a diferença nos percentuais de similaridade de 90% e 79% respectivamente.

Tabela 9. Perfil dos eletromorfos encontrados nas análises dos oito “locus” isoenzimáticos das estirpes do gênero *Brevibacillus* e seu grupamento dentro de 24 “zymovares” (continua).

Espécie/ Locus	ACON	ADH	FUM	GPI	IDH	LDH	MDH	ME	Zymovares
BL856	1	1	1	2	1	1	3	1,3	1
CCEB 342	1	1	1	2	1	1	3	1	2
BON 706	2	2	2	3	2	2	4	0	3
NRS 1646	1	1	1	1	1	1	1	1	4
NRS 661	1	1	1	1	1	1	3	1	5
SHI 4	1	2	1	2	1	1	3	1	6
SHI 2	1	1	1	2	1	1	3	1	2
ATCC 9141	1	1	1	2	1	1	3	1	2
ATCC 6457	1	1	1	2	1	1	3	2	7
SHI 3	1	2	1	1	1	1	3	1	8
SHI 5	1	1	1	2	1	1	3	0	9
NRS 340	2	2	0	1	2	2	0	0	10
BON 707	1	1	0	2	1	1	3	1	11
BON 712	1	1	1	1	1	1	3	1,2	12
NRS 1111	1	1	1	1	1	1	3	1,2	12
NRS 1247	1	1	1	1	1	1	3	1,2	12
NRS 1264	1	1,2	1	1	1	1	3	1,2	13
NRS 1338	1,2	1	1	1	1	1	3	1,2	14

Tabela 9. Continuação

Espécie/ Locus	ACON	ADH	FUM	GPI	IDH	LDH	MDH	ME	Zymovares
NRS 1642	1,2	1	1	1	2	1	3	1,2	15
NRS 1643	1	1	1	0	1	1	3	1,3	16
NRS 1645	1	1	1	1	1	1	3	1	5
NRS 1647	1	1	1	1	1	1	3	1	5
NRS 1648	1	1	1	1	2	1	3	1	17
SHI 1	1	1	1	1	1	1	3	1,3	18
ATCC64	1	1	1	1	1	1	3	1	5
NRS 1883	1	1	1	1	1	1	3	1	5
NRS 590	1	1	1	1	1	1	3	1	5
BL 16-92	1	2	1	0	2	2	3	1	19
LFB-052	3	2	2	3	1	2	4	2	20
NRS 1267	1	1	1	2	1	1	3	1	2
CCBH 5765	0	1	1	1	2	0	1	0	21
Ad 439	0	1	1	1	1	1	3	1	22
Ad 647	2	2	1	0	3	2	2	1,3	23
Ad 681	1	1	1	3	1	1	3	1	24

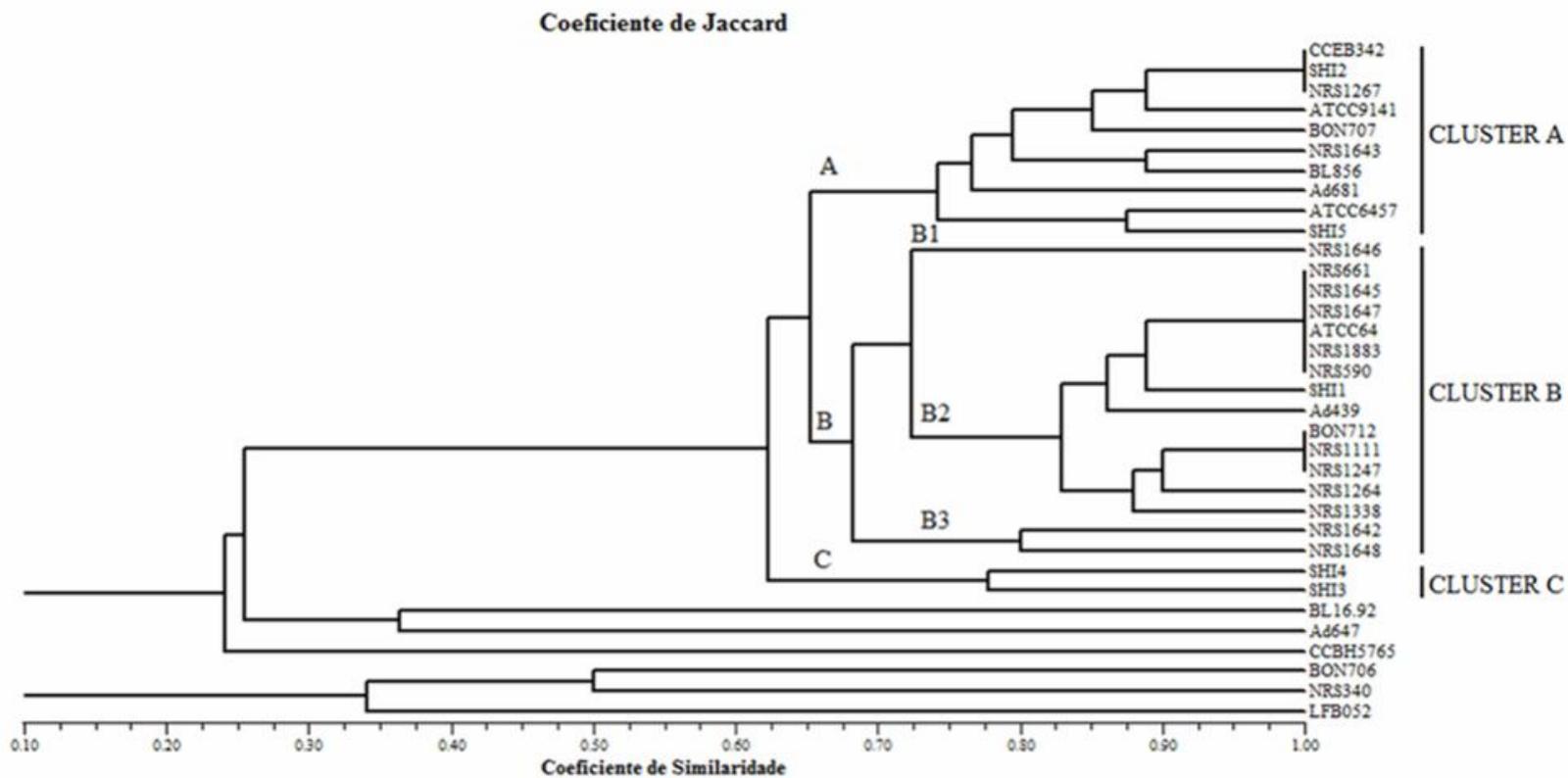


Figura 7. Análise fenética utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis de isoenzimas por MLEE, em três diferentes clusters (A, B, C).

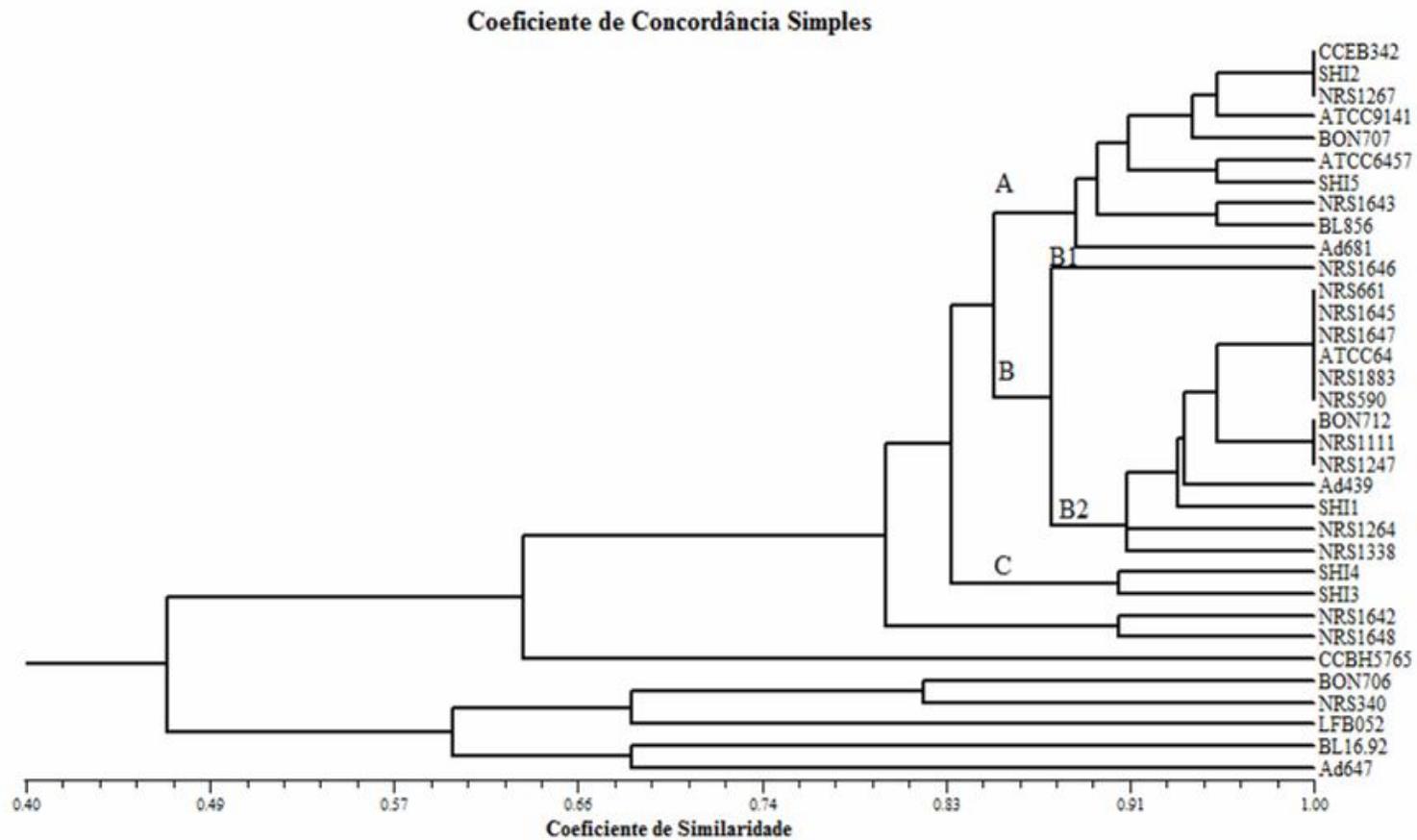


Figura 8. Análise fenética utilizando-se o coeficiente de Concordância Simples (Simple Matching) e o algoritmo de UPGMA mostrando o agrupamento dos perfis isoenzimas por MLEE, em diferentes clusters.

4.5.2 Reação em cadeia da polimerase - PCR-BREV

A PCR com o primer BREV (BREV174F/1377R) foi realizada com a intenção de autenticação das estirpes utilizadas neste trabalho. Na figura 9 os produtos gerados pela amplificação com este primer resultaram em uma banda com aproximadamente 1.2Kb, que podem ser facilmente visualizadas. Com este resultado podemos confirmar que todas às estipes utilizadas neste trabalho pertenciam ao gênero *Brevibacillus*. Conforme esperado as estirpes *B. thuringiensis* e *B. cereus* utilizadas como controle não apresentaram a banda comum apenas às estirpes deste gênero (Figura 9).

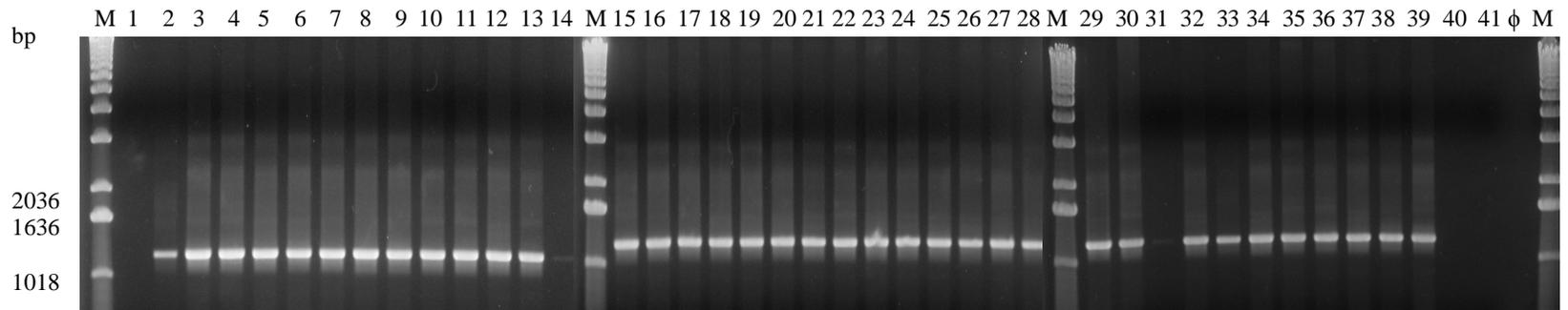


Figura 9. Produtos das ampliações com primer BREV (BREV174F/1377R) específico para o gênero *Brevibacillus*, em gel de agarose ultra pura 1,2%, TBE 1X. M: marcador molecular 1Kb ladder invitrogen; 1: controle negativo; 2: controle positivo (LFB052) 3 a 32: estirpes de *Br laterosporus*; 33: *Br brevis* (clínico); 34 a 37: *Br agri*; 38: *Br parabrevis*; 39: *Br laterosporus*; 40: *Bacillus thuringiensis*; 41: *Bacillus cereus*.

4.5.3 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD-PCR

A técnica de RAPD-PCR foi utilizada para comparar os perfis das novas estirpes obtidas do ADRIA Developpement – IDEA Unit – Interaction & Dynamics of Microbial Ecosystems in Food, France (Tabela 1). Os primers OPA 11, OPA 02 e OPA 04 (Figuras 10,11 e 12) apresentaram um alto nível de polimorfismo em todas as estirpes do gênero *Brevibacillus* testadas. Os produtos gerados com o primers OPA 11 demonstraram que está técnica foi reprodutível, pois foi possível visualizar a banda de aproximadamente 900pb descrita em trabalhos anteriores como marcador molecular das estirpes de *Br. laterosporus* testadas. Na figura 10 algumas das amostras recebidas do ADRIA Developpement (Ad 439 e Ad 681) foram observadas a presença da banda de aproximadamente 900bp comum as estirpes de *Br. laterosporus*, além disso, os perfis destas estipes que foram gerados pela amplificação com os primers OPA11 e OPA02 (Figura 10 e 11) foram idênticos aos perfis das estirpes NRS 1247, NRS 1264, NRS 1267, e também com o perfil da estirpe Shi 3 gerado apenas com o primer OPA02 (Figura 11). As estirpes BL 16-92, NRS 1642, NRS 1648 e NRS 340 consideradas *Br. laterosporus* não foi detectada há presença da banda de 900bp (Figura 10). Esta técnica quase permitiu gerar um perfil individual para cada estirpe, demonstrando que ela é sensível a diferenças intraespecíficas e também interespecífica, como podemos observar pelas estirpes de *B. thuringiensis* e *B. cereus* utilizados como controle.

Para o primer OPA11 foi possível verificar a presença de 22 tipos eletroforéticos, nos quais as estirpes que apresentam potencial patogênico ficaram amplamente distribuídas, não permitindo a formação de nenhum grupo de cepas com potencial ou maior potencial para o controle biológico (Figura 10). Com o primer OPA02 foi possível observar a presença de 21 tipos eletroforéticos, onde as cepas com potencial para o controle biológico também foram dispersas (Figura 11). Ao comparar os tipos eletroforéticos formados e as estirpes que dele fazem parte é notável que em sua grande maioria estas mesmas sejam sempre agrupadas igualmente. Um exemplo disto é que no tipo eletroforético 1 (ET1), do primer OPA11 estão agrupadas as cepas NRS 1111, BON 706, NRS 661, BON 712 e no ET1 do primer OPA02 e OPA04 estão presentes as mesmas amostras.

Nas ampliações com o primer OPA04 apenas 19 ETs foram observados, isto pode estar relacionado com a não amplificação de algumas estirpes como: NRS 1264, NRS 590 e *B. thuringiensis* (Figura 12). Como nos demais produtos gerados pela amplificação por outros primers neste não foi diferente, pois as estirpes com potencial patogênico ficaram dispersas em diversos ETs. Foi possível notar também que apenas a presença ou ausência de uma banda, diferencia as estirpes de *Br. laterosporus* testadas, entretanto nas demais espécies do gênero *Brevibacillus* e *Bacillus* utilizadas nesta técnica os perfis gerados apresentaram grandes diferenças.

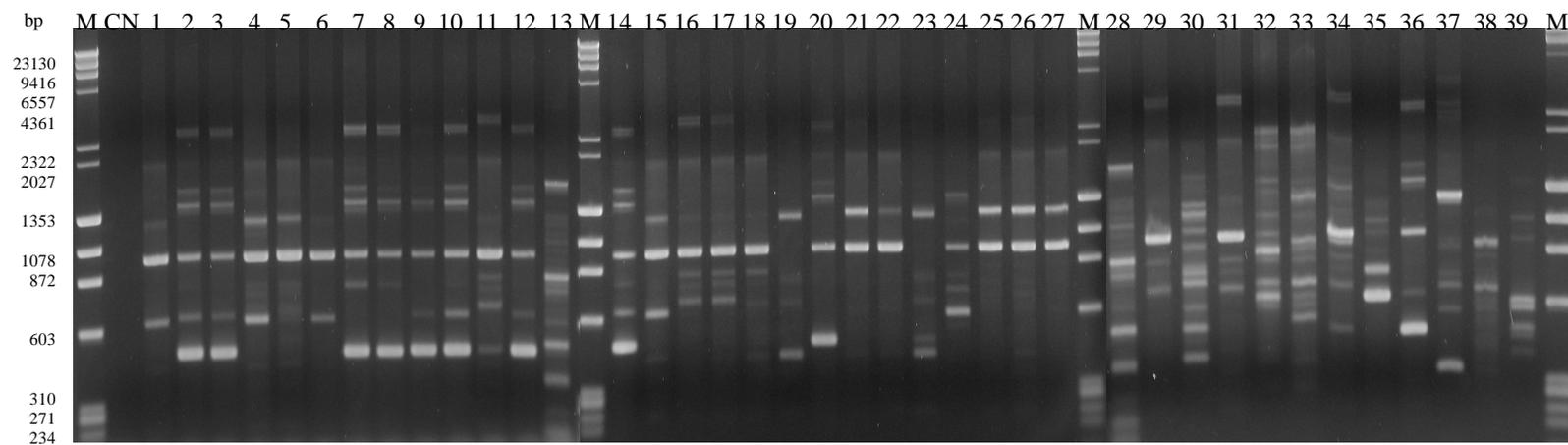


Figura 10. Perfis gerados por RAPD-PCR com o primer OPA 11 mostrando a variabilidade genética nas estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades, em gel de agarose ultra pura 1,5%, TBE 1X. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III; 1: controle negativo; 2 a 29: estirpes de *Br laterosporus*; 30: *Br brevis* (clínico); 31 a 34: *Br agri*; 35: *Br parabrevis*; 36: *Br laterosporus*; 37: *Br brevis*; 38: *Bacillus thuringiensis*; 39: *Bacillus cereus*.

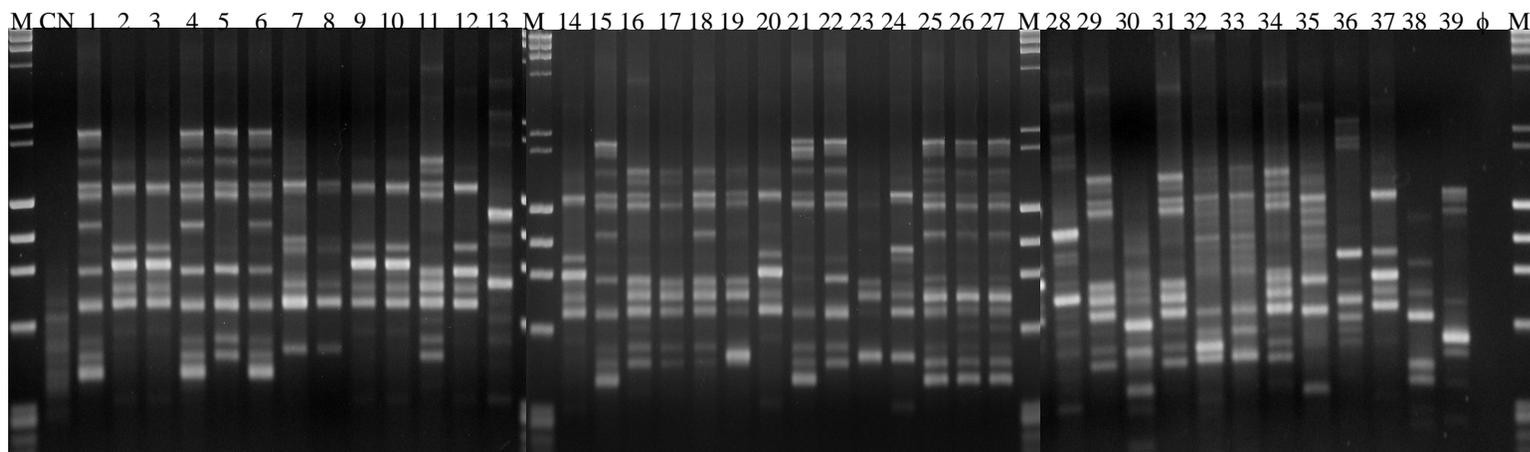


Figura 11. Perfis gerados por RAPD-PCR com o primer OPA 02 mostrando a variabilidade genética nas estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades e como controle estirpes do gênero *Bacillus*, em gel de agarose ultra pura 1,5%, TBE 1X. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III; 1: Controle Negativo; 2 a 29: estirpes de *Br laterosporus*; 30: *Br brevis* (amostra clínica); 31 a 34: *Br agri*; 35: *Br parabrevis*; 36: *Br laterosporus*; 37: *Br brevis*; 38: *Bacillus thuringiensis*; 39: *Bacillus cereus*; ϕ : sem amostra.

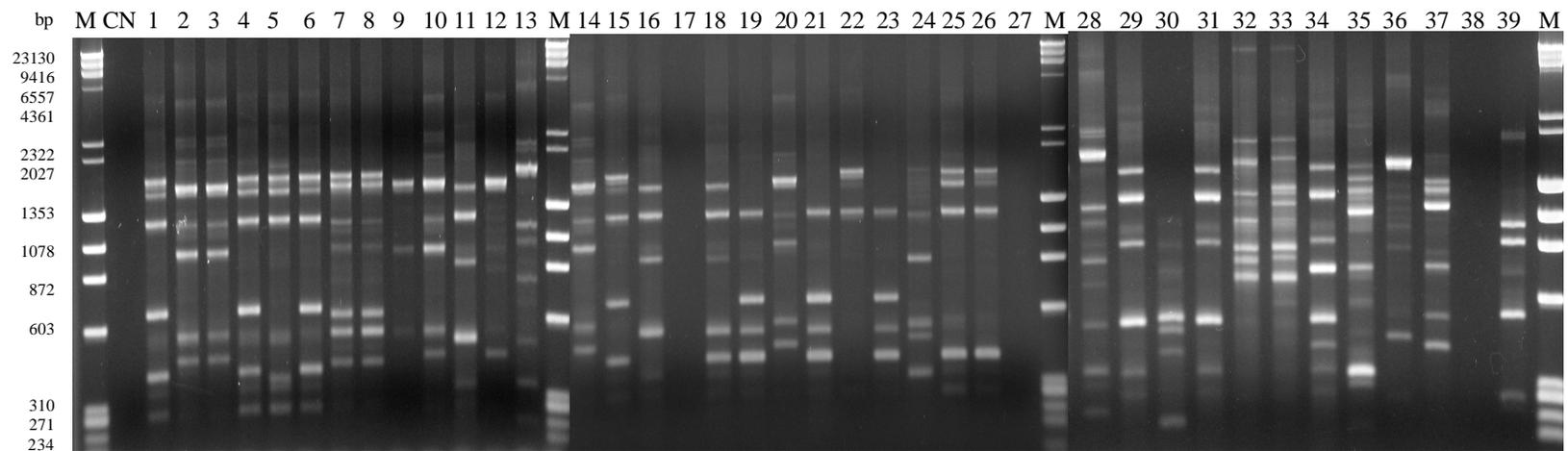


Figura 12. Perfis gerados por RAPD-PCR com o primer OPA 04 mostrando a variabilidade genética nas estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades e como controle estirpes do gênero *Bacillus*, em gel de agarose ultra pura 1,5%, TBE 1X. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III invitrogen; 1: Controle Negativo; 2 a 29: estirpes de *Br laterosporus*; 30: *Br brevis* (amostra clínica); 31 a 34: *Br agri*; 35: *Br parabrevis*; 36: *Br laterosporus*; 37: *Br brevis*; 38: *Bacillus thuringiensis*; 39: *Bacillus cereus*.

4.6 Análise Plasmidial

4.6.1 Kits de extração

Através dos testes realizados com Kits de extração plasmidial de diferentes empresas comerciais, foi possível identificar a presença de plasmídeos com diferentes conformações e número de cópias devido a sua localização e coloração (forte ou fraca) no gel de agarose (Figura 13). Na figura 13 as bandas visualizadas acima do DNA cromossomal foram consideradas plasmídeos grandes (supercoiled), pois estão acima da banda de 23.130 bp do marcador de peso molecular, que significa que apresentam mais que 23kb e as bandas que se apresentaram abaixo do DNA cromossomal entre as bandas de 9.416bp e 6.557bp do marcador molecular foram consideradas plasmídeos pequenos (lineares ou circulares), pois possuem aproximadamente 7Kb. Apesar de este resultado ser bem visualizado no gel de agarose apresentado na figura 13 houve um grande rastro dificultando a visualização de outras bandas menores com baixo número de cópias caso elas existissem no mesmo gel. Ainda na figura 13, a visualização dos marcadores de peso molecular foi difícil devido à concentração do gel ser de 0,5%, o que permite sua difusão no gel com maior facilidade e rapidez.

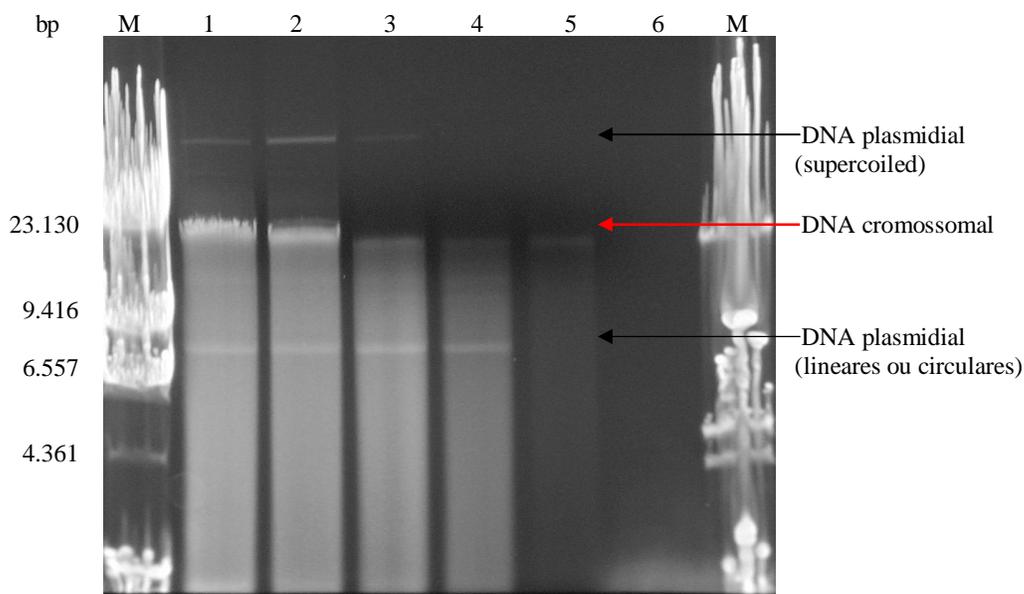


Figura 13. DNA plasmidial extraído da estirpe de *Br laterosporus* (Shi 1) por Kits comerciais em gel de agarose ultrapura 0,5%, TBE 1X, por 3 horas a 80V. M: marcador molecular λ DNA EcoRI/Hind III invitrogen; 1: Invitrogen; 2: Macherey Nagel; 3: Fermentas; 4: Roche; 5: Invitrogen diluído 1:10; 6: ϕ sem amostra.

4.6.2 Minipreparação

Os resultados apresentados por esta técnica com menos rastro podem ser observados na Figura 14, onde o DNA plasmidial e cromossomal extraído das diferentes estirpes do gênero *Brevibacillus* podem ser visualizados em gel de agarose 0,7%. Nas estirpes NRS1647, Shi 1, Shi 5, NRS 1643, Shi 3, NRS 1645, NRS 1264, é possível visualizar a presença de

plasmídios grandes (“supercoiled”) com peso acima de 23Kb, pois estão acima da banda de 23.130bp do marcador de peso molecular. Por serem plasmídeos maiores, a presença de bandas mais fracas com pouca visualização em gel de agarose, pode estar relacionada, na maioria das vezes, a apenas uma cópia dentro do organismo estudado. Na Figura 14 os plasmídeos de tamanhos menores (lineares ou circulares) apresentam-se com bandas mais fortes e melhor visualização, isto por serem capazes de estar em maior número de cópias dentro da estirpe em análise. Eles estão presentes nas estirpes ATCC 6457, NRS 1647, Shi 1, NRS1648, ATCC 9141, BI 16-92, NRS 1643, CCEB 342, BON 707, NRS1645, NRS 340, NRS 1646, BON 712, NRS 1264, NRS1642 (Figura 14). A presença destes plasmídeos pequenos em um número maior de estirpes pode estar relacionada também a transmissão destes plasmídios entre as próprias estirpes de *Br. laterosporus*. Contudo, estes não estão relacionados com o potencial patogênico das estirpes, pois dentro do grupo de estirpes que apresentaram plasmídeos pequenos ou grandes, estão inclusos cepas com baixo ou nenhum potencial patogênico, e em algumas cepas como NRS1111 e NRS590, que apresentam alto potencial para uma diversidade de alvos já testados anteriormente não foi possível visualizar nenhum plasmídio. Portanto não há ligação entre potencial patogênico e presença de plasmídios nas estirpes de *Br. laterosporus*.

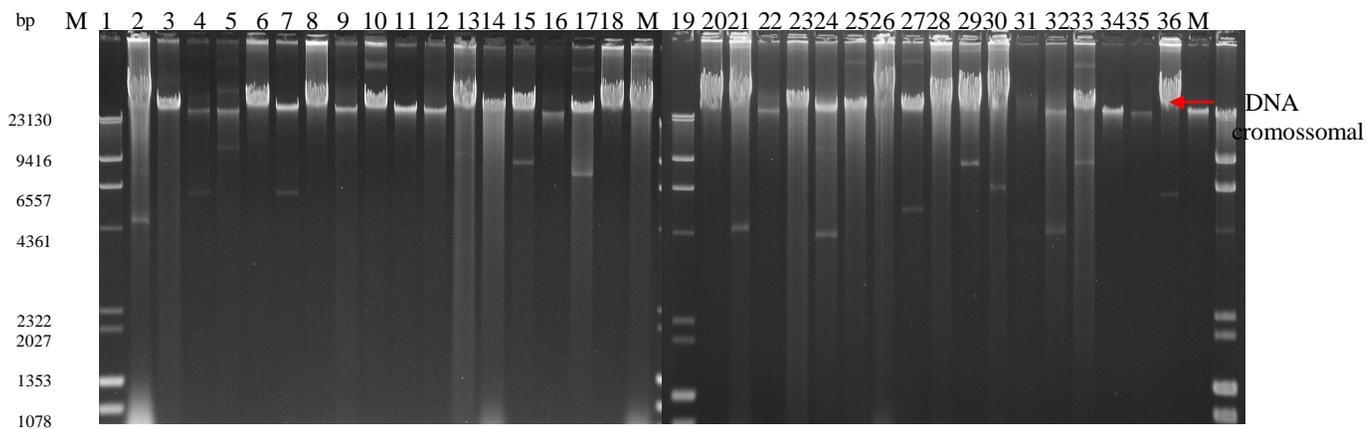


Figura 14. Plasmídeos extraídos por miniprep das estirpes do gênero *Brevibacillus* isoladas de diferentes localidades, em gel de agarose ultra pura 0,7%, TBE 1X, por 4 horas a 60V. M: marcador molecular λ DNA Hind III com Φ X 174 Hae III invitrogen; 1: ATCC6457; 2: NRS1338; 3: NRS1647; 4: Shi1; 5: Ad681; 6: NRS1648; 7: Ad647; 8: NRS1267; 9: Shi5; 10: Bon706; 11: NRS590; 12: ATCC9141; 13: NRS1247; 14: BI16-92; 15: NRS1111; 16: NRS1643; 17: Ad541; 18: Ad439; 19: Bon712; 20: CCEB342; 21: NRS1883; 22: Ad682; 23: Bon707; 24: Shi3; 25: Shi2; 26: NRS1645; 27: Shi4; 28: NRS340; 29: NRS1646; 30: ATCC9141; 31: Bon712; 32: NRS1264; 33: ATCC64; 34: LFB052; 35: NRS1642; 36: NRS661.

4.6.3 Plasmídios por PFGE

A análise dos plasmídios através da técnica de eletroforese de campo pulsado, permitiu a visualização em gel de agarose 1%, dos plasmídeos que apresentavam peso molecular acima de 50Kb. As moléculas de DNA que apresentam sua conformação altamente enovelada em eletroforese unidirecional não são capazes de se mover. Portanto a técnica de PFGE, que alterna as direções dos pulsos elétricos, faz com que estas moléculas se movam em direção ao cátodo.

Na tabela 10, foram descritos os números de bandas e seus respectivos pesos moleculares presentes nos géis da corrida por PFGE e Miniprep para efeito comparativo entre os dois testes e diante da mesma é possível confirmar que a técnica de PFGE permitiu a detecção de bandas maiores que 50Kb, as quais não puderem ser vistas em corrida unidirecional. Esta técnica também corroborou com os resultados obtidos na técnica anterior, pois mesmo na ausência de plasmídeos visíveis em gel de agarose algumas estirpes apresentam patogenicidade, são elas: ATCC 64, ATCC 9141, NRS 1338, SHI 2, BON 706, NRS 1111, BON 712, NRS 661. Estas estirpes foram descritas como patogênicas por Oliveira et al. (2004) em diferentes ensaios para diferentes alvos.

Tabela 10 Perfil plasmidial encontrado nas estirpes do gênero *Brevibacillus* e *Bacillus*, através das diferentes técnicas de PFGE e Miniprep com corrida eletroforética unidirecional, para visualização dos números de bandas e pesos moleculares em Kilobases.

Estirpes	Nº de bandas em PFGE	Tamanho em *Kb	Nº de bandas em Miniprep	Tamanho em *Kb
NRS1267	1	≅200Kb	*N	*-
BI 16-92	*N	*-	1	9.4 Kb
NRS 590	1	≅95 Kb	N	-
NRS1883	N	-	N	-
ATCC64	N	-	N	-
SHI I	3	≅200 Kb ≅190 Kb ≅150 Kb	3	≅50 Kb ≅40 Kb 12.8 Kb
NRS 1648	N	-	1	6 Kb
NRS 1647	2	≅130 Kb ≅120 Kb	1	6 Kb
NRS 1645	3	≅310 Kb ≅120 Kb ≅50 Kb	2	≅50 Kb 5.9 Kb
NRS 1643	2	≅295 Kb ≅145 Kb	2	≅50 Kb 7.9 Kb
NRS 1642	N	-	1	6.5 Kb
NRS 1338	N	-	N	-
NRS 1264	1	≅250 Kb	2	≅50 Kb 8 Kb
NRS 1247	1	≅240 Kb	N	-
NRS 1111	N	-	N	-
BON 712	N	-	N	-
BON 707	N	-	1	4.3 Kb
NRS 340	N	-	1	8 Kb
SHI 5	3	≅310 Kb ≅295 Kb ≅250 Kb	1	≅50 Kb
SHI 3	N	-	1	≅50 Kb
ATCC6457	N	-	1	4.9 Kb
ATCC 9141	N	-	N	-
SHI 2	N	-	N	-
SHI 4	N	-	N	-
NRS 661	N	-	N	-
NRS 1646	1	≅160 Kb	1	6.6 Kb
BON 706	N	-	N	-
CCEB 342	N	-	1	4.9 Kb
LFB052	N	-	N	-
LFB NI-176	1	≅170 Kb	N	-
LFB AI-67	2	≅300 Kb ≅170 Kb	N	-
Ad 439	N	-	N	-
Ad 541	N	-	N	-
Ad 682	N	-	N	-
Ad 681	N	-	N	-
Ad 647	2	≅150 Kb ≅100 Kb	N	-

*N não há bandas/ - não há peso molecular/ Kb- kilobases

5 DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios

Através dos resultados obtidos neste trabalho pode se observar que as estirpes NRS 1111 e NRS 590 de *Br. laterosporus* foram capazes de influenciar no desenvolvimento de *C. felis felis*, pois houve diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos, demonstrando o potencial patogênico destas estirpes para esta espécie de pulga. Este potencial já havia sido descrito para diferentes ordens de insetos e outros organismos por diversos autores (SINGER, 1996; ZAHNER et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004; RUIU et al., 2007). O resultado obtido para a estirpe NI 176 de *B.thuringiensis* também demonstrou patogenicidade, pois houve diferença significativa no número de adultos emergidos para o controle e não diferiu das duas estirpes de *Br. laterosporus*. Apesar de promissoras no controle da pulga *C. felis felis* e demais alvos, os diferentes níveis de patogenicidade encontrado entre as varias estirpes de *Br. laterosporus* tem sido pouco estudados. Esta diferença nos níveis de toxicidade e no espectro de atividade aumenta a necessidade da melhor caracterização destas estirpes e ou toxinas e a busca de novas estirpes que possam usadas contra outros insetos alvos.

O tratamento realizado neste trabalho sobre as larvas de pulgas *C. felis felis* apresentaram bons resultados, obtendo percentuais de controle variando de 78% a 96,7% no primeiro bioensaio, sendo estes valores excelentes para o controle biológico. Através dos experimentos com os diferentes estágios de desenvolvimento da bactéria, tentamos identificar a fase de atividade patogênica das cepas em teste, entretanto, os bioensaios realizados não demonstraram diferença significativa entre os diferentes estágios de desenvolvimento, contudo foi possível observar que no estágio vegetativo (fase exponencial) já havia ação patogênica e que esta se estendeu durante a fase de esporulação. Isto corrobora o resultado obtido por Oliveira et al. (2004) que durante a fase vegetativa verificaram a produção da toxina inseticida responsável pela atividade biocida e afirmaram que esta atividade foi mantida durante a esporulação. Este fato também pode ser verificado em estirpes de *B. sphaericus*, que durante a fase vegetativa, produzem e secretam no meio onde sofrem degradação proteolítica, as toxinas Mtx. Por esta razão, as toxinas Mtx não apresentam ação tóxica em culturas esporuladas (MELO et al., 2007). Favret e Yousten (1985), realizando bioensaios com a massa celular em esporângio (8hs de crescimento) da estirpe NRS 590, conseguiram demonstrar que este estágio produzia alta atividade tóxica contra a larva de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Simulium vittatum* e que as células irradiadas da estirpe NRS590 apresentaram atividade larvicida similar das células não irradiadas pela luz UV, não estando, portanto, esta atividade ligada ao esporo ou ao corpo parasporal. Estes autores ainda relatam que esta estirpe demonstrou um nível de toxicidade mil vezes menor que a estirpe IPS-78 de *B. thuringiensis*.

Segundo Singer (1996), os bioensaios realizados contra larvas neonatas de *Lasioderma serricorne*, estipes de *Br. laterosporus* demonstram que a atividade larvicida se inicia quando as culturas têm 12hs de crescimento e obtêm o máximo com 18hs, mas ainda uma atividade remanescente pode ser vista com 48hs de crescimento.

Já Ruiu et al (2007) descrevem em seu trabalho que as células vegetativas durante a fase exponencial não foram tóxicas quando testadas contra larvas de *Musca domestica* e *A. aegypti*, contudo uma toxicidade baixa foi encontrada na fase estacionária, mas apenas os esporos contem a principal fração patogênica. Este trabalho foi consistente com Rivers et al. (1991) que utilizou culturas de células esporuladas e sonicadas, onde foi possível demonstrar

que a estirpe ATCC 9141 foi a que apresentou maior atividade inseticida contra *A. aegypti* das 28 estirpes testadas. Contudo, tais diferenças encontradas por nós e outros autores, claramente demonstram a toxicidade variável entre as diversas estirpes desta bactéria.

Em nossos ensaios, podemos observar que em tratamentos realizados com a estirpe NRS 1111, o potencial patogênico concentrou-se nas células vegetativas (18hs de crescimento) e foi diminuindo ao longo dos demais estágios, já com a estirpe NRS 590 no estágio vegetativo (18hs de crescimento) o potencial foi baixo e aumentou no estágio de esporângio (48hs de crescimento) se mantendo o mesmo em esporo livre (72hs de crescimento). A estirpe NI 176, por ser a espécie de *B. thuringiensis*, apresentou outro comportamento, demonstrando seu potencial patogênico no estágio de esporo livre.

Em tratamentos realizados com as amostras bacterianas liofilizadas, em todos os estágios de crescimento, o resultado não diferiu muito do realizado com a suspensão, pois não houve diferença significativa entre os controles e os tratados, nem entre os estágios de crescimentos. Isto pode ser devido ao fato de que as células vegetativas e esporângios sejam mais sensíveis as etapas do processo de liofilização que os esporos livres. Outro fator preponderante é o fato do liófilo ser altamente higroscópico, facilitando a aderência da dieta a parede e fundo do tubo, por este motivo também este ensaio foi colocado em caixas de isopor onde a umidade não interferiria tanto no desenvolvimento da pulga, não promovendo a formação de grumos no material da dieta e o crescimento de fungos. Rugar et al (2003) em sua patente, utilizou proteínas CryET29 de *B. thuringiensis* (EG4096) no controle de *C. felis felis*. Sua experimentação baseou-se na utilização de proteínas liofilizadas que foram misturadas ao sangue seco de bovino e esta foi suspensa em Triton X-100, colocada para secar em placas de Petri e dentro destas placas foram colocadas as larvas de pulgas para os bioensaios. Após sete dias o percentual de mortalidade mais alto encontrado foi 100%, quando foram adicionadas 10000ppm da proteína tóxica, enquanto que em baixas concentrações da proteína o potencial de ação foi menor. Em 1000ppm da proteína tóxica a mortalidade das larvas de pulgas caiu para 43%. Este fator também pode ser observado em nossos experimentos, pois quando diminuimos os volumes adicionados a dieta, pouca mortalidade pode ser observada. Porém os valores encontrados por Rugar et al. (2003) nos ensaios com *B. thuringiensis*, ainda sim foram maiores que os nossos, para esta estirpe em questão.

De acordo Schnepf et al. (2003) as toxinas de *Br. laterosporus* podem ser obtidas do sobrenadante da cultura e esta proteína pode interagir com receptores de membrana permitindo a formação de poros nas células. Ainda segundo os mesmos autores é possível que esta toxina possa ser usada como secundária, apenas abrindo um canal para que outra proteína possa agir destruindo a célula.

O potencial tóxico observado em algumas espécies do gênero *Bacillus* como *B. thuringiensis* e *B. cereus* são dependentes, em alguns casos, não só da formação do esporo como também do cristal protéico. Em *Br. laterosporus*, a toxicidade pode estar associada a parede celular, ou a enzimas extracelulares produzidas durante a fase vegetativa de crescimento, como ocorre em *B. sphaericus* em que uma das toxinas mosquitocidas codificadas pelos genes Mtx são sintetizadas durante a fase vegetativa de crescimento. Entretanto, estas não se acumulam nos cristais e são inativadas ao final da fase exponencial por proteases (THANABALU; POTER, 1996; CHARLES et al., 1996).

Um fator que dificultou as análises foi a manutenção da colônia de *C. feli felis* utilizada. Como podemos verificar nos resultados obtidos nos bioensaios, apenas no primeiro verificamos resultados de elevada produção de adultos no grupo controle, a partir do segundo bioensaio tivemos muitas dificuldades na manutenção desta colônia, o que pode ser verificado pela baixa produção de adultos em todos os grupos controle. A este fato foi atribuído uma possível homozigose na colônia que pode afetar o número de indivíduos que nascem e

sobrevivem até tornarem-se adultos. Este fato tentou ser contornado com a busca externa ao laboratório de pulgas adultas para a renovação da colônia e novas infestações, entretanto não tivemos êxito, o que nos leva a supor haver algum problema relacionado com a dieta utilizada na manutenção de larvas de *C. felis felis*, pois foi observado que o tempo médio de formação de adultos estava acima de 30 dias e que muitas larvas não se alimentavam do sangue desidratado da dieta, pois não era visível a coloração castanha no interior do seu tubo digestivo.

5.2 Tipagem Molecular

Atualmente é grande o número de métodos de caracterização de bactérias tanto ao nível de informação genotípica, DNA ou RNA (composição de bases, padrão de restrição, hibridização, seqüenciamento e sondas), informação fenotípica baseada em proteínas (padrão de proteínas totais ou eletroforese de isoenzimas), marcadores quimiotaxonômicos (ácidos graxos, ácidos micólicos e quinonas) ou em informação baseada em características expressas como morfologia e metabolismo. Em nosso trabalho foram realizadas diversas técnicas a fim de caracterizarmos melhor as estirpes aqui descritas, por ainda hoje a literatura não conseguir esclarecer melhor as relações fenéticas destes microrganismos e seu potencial no controle de vetores e pragas.

A eletroforese de isoenzimas apesar de não trabalhar diretamente com o DNA, pode ser interpretada como uma expressão direta do gene uma vez que não é afetada por fatores extrínsecos.

Singer (1996) relatou que a técnica de MLEE permitiu separar as estirpes de *Br. laterosporus* patogênicas de não patogênica. Zahner et al. (1999) utilizando-se da mesma técnica, com 13 diferentes enzimas ensaiadas, descreveu baseados em seus dados que não foi possível discriminar estirpes patogênicas de isolados não patogênicos. Em nosso trabalho, MLEE foi aplicada no intuito de aumentar o número de loci testados por Zahner et al. (1999), a fim de se obter o mesmo resultado descrito por Singer (1996). De acordo com Selander et al. (1986) para ser uma amostra representativa dos genes estruturais do genoma bacteriano, de 15 a 25 enzimas devem ser ensaiadas, e estas podem estimar os níveis de variação genética dentro de populações e o grau de parentesco entre isolados, populações e espécies.

Através dos perfis isoenzimáticos obtidos pela técnica de MLEE em nossos experimentos, foi possível observar altos níveis de similaridade (62% a 100%) entre as estirpes de *Br. laterosporus* e a baixa variabilidade genética intraespécies, entretanto esta ferramenta permitiu determinar baixos níveis de similaridades (25% e 35%) entre as demais estirpes do gênero *Brevibacillus* e a alta variabilidade genética mostrando-se eficiente na caracterização interespecie. A baixa diversidade encontrada entre as estirpes de *Br. laterosporus* confirmam os resultados descritos por Singer (1996), que descreveu estas estirpes como um cluster fortemente unido, facilmente distinguido de outros grupos. Porém a correlação entre os dados gerados por este estudo e os bioensaios realizados não puderam ser estabelecidas, pois as estirpes que apresentam perfil patogênico ficaram distribuídas dentro dos diferentes grupos gerados pelo dendrograma, não permitindo assim a separação de estirpes patogênicas de não patogênicas. Em contraste, Zahner et al. (1994), através de MLEE, conseguiu encontrar um marcador molecular para as estirpes mosquitocidas, mesmo sendo *B. sphaericus* uma espécie bastante heterogênea. O mesmo não foi encontrado para as estirpes de *B. thuringiensis* (ZAHNER et al., 1989). Talvez a localização dos genes responsáveis pelas toxinas seja o motivo dessa diferença: enquanto que em *B. sphaericus* os genes são cromossômicos, portanto mais conservados, em *B. thuringiensis* os genes, em sua grande maioria, estão localizados em plasmídeos. Em *Br. laterosporus* ainda não existem relatos sobre suas toxinas ou genes relacionados a elas.

O dendrograma obtido para o coeficiente de Jaccard demonstrou que não há correlação entre os grupos formados e os perfis patogênicos gerados a partir dos bioensaios. Para *Br. laterosporus* a origem da toxicidade não pertence a um único grupo, estando dispersa em diferentes estirpes. Maiores estudos poderão ser realizados na tentativa de se avaliar a origem evolucionária dessas toxinas.

Para uma rápida identificação das estirpes do gênero *Brevibacillus*, nós utilizamos a técnica de amplificação por PCR com os primers descritos por Shida et al. (1996) para regiões específicas do gene 16S rRNA. Os primers BREV174F e 1377R de acordo com os mesmos autores foram altamente específicos para esse gênero. Contudo a presença de duas amostras com menor visualização no gel, está relacionada a contaminação das mesmas, este fato foi confirmado por posterior seqüenciamento realizado com os primers 16S RNAr (dados não mostrados). As demais amostras apresentaram boa amplificação e os controles utilizados *B. thuringiensis* e *B. cereus* como esperado não apresentaram nenhuma banda no gel, o que evidencia a especificidade dos primers descritos pelo autor para o gênero *Brevibacillus*.

A técnica de RAPD-PCR foi utilizada com a finalidade de comparar os perfis previamente descritos por Zahner et al. (1999) para todas as estirpes de *Br. laterosporus* com outras amostras de diferentes origens. Algumas isoladas de alimentos na França e uma de origem de paciente hospitalar.

De acordo com resultados publicados previamente, o primer OPA11 apresentou um alto nível de polimorfismo e adicionalmente a banda de aproximadamente 900bp pode ser visualizada o que corrobora os resultados descritos por Zahner et al. (1999), sobre um marcador molecular para todas as estirpes de *Br. laterosporus*. Em contrapartida, os perfis gerados para as novas amostras nos surpreenderam, pois cepas descritas previamente como *Br. agri* (Ad 439, Ad 681), em nossos resultados apresentaram a banda de aproximadamente 900bp, comum apenas as estirpes de *Br. laterosporus*. Entretanto, em comparação com a técnica de isoenzimas aplicada as mesmas estirpes, foi possível visualizar dentro do dendrograma que estas cepas apresentaram uma similaridade de 86% e 77% respectivamente para as estirpes de *Br. laterosporus*, ficando assim distribuídas entre os clusters B e A respectivamente. Além disso, os perfis destas estirpes que foram gerados pela amplificação com os primers OPA11 e OPA02 foram idênticos aos perfis das estirpes NRS 1247, NRS 1264, NRS 1267, e também com o perfil da estirpe Shi 3 gerado apenas com o primer OPA02. Devido a estes resultados sugerimos que estas duas estirpes eram *Br. laterosporus*, contudo para que pudéssemos confirmar tais resultados foram feitos seqüenciamentos dessas duas estirpes (dados não mostrados) com os primers para a região conservada 16S rRNA (515F/806R, 515F/ 1175R e ainda 515F/ 1492R), onde obtivemos o resultado de 99% e 100% de homologia no banco de seqüências com a estirpe de *Br. laterosporus* para as duas amostras sequenciadas. Estes resultados não só apenas confirmaram nossas suspeitas como também afirmaram que estas técnicas são capazes de caracterizar e identificar estirpes.

As técnicas de Miniprep com eletroforese convencional e PFGE produziram resultados satisfatórios, pois permitiram a visualização do perfil plasmidial de acordo com as limitações de cada técnica e com estes resultados foi possível correlacionar o perfil patogênico com a presença de plasmídios nas diversas estirpes testadas. Para as estirpes do gênero *Brevibacillus* este será o primeiro relato em literatura da detecção de plasmídeos e sua correlação com patogenicidade. O interesse na descoberta deste DNA iniciou-se por diversos autores relatarem que muitos genes codificantes para proteínas Cry são carregados por plasmídeos com diversos pesos moleculares. Segundo Reyes-Ramírez e Ibarra (2008) essas proteínas são codificadas por megaplasmídeos, embora também seja sugerida a presença deles no cromossoma. Os plasmídeos foram associados com a produção de diferentes toxinas. A relevância deles em *B. thuringiensis* é associada por sua regular presença em “sets” de plasmídeos que podem variar em número e peso. Ainda de acordo com os autores, perfis

plasmidiais tem sido usados para caracterizar as estirpes. Em nossos resultados foi possível observar a presença de plasmídeos grandes e pequenos, onde de acordo com Sambrook et al. (2001), moléculas de DNA plasmidial maiores que 15Kb são considerados plasmídeos grandes e menores que este são considerados plasmídeos pequenos. Porém não existe correlação entre a presença deles e o potencial de patogenicidade de *Br. laterosporus*, pois estirpes que foram consideradas altamente tóxicas por Oliveira et al. (2004) como: ATCC 64, ATCC 9141, NRS 1338, SHI 2, BON 706, NRS 1111, BON 712, NRS 661, não apresentaram plasmídeos em nenhuma das técnicas utilizadas. Este fato sugere que o potencial patogênico destas estirpes está ligado ao DNA cromossomal destas bactérias.

6 CONCLUSÃO

As seguintes conclusões foram elaboradas com base nos resultados obtidos em nossos estudos.

1 As estirpes NRS 1111 e NRS 590 de *Br. laterosporus* apresentaram potencial patogênico contra pulgas da espécie *C. felis felis*.

2 Através dos resultados dos diferentes bioensaios realizados não é possível afirmar qual foi a melhor técnica utilizada para os testes in vitro contra as larvas de pulga.

3 Será necessário novos ensaios e maiores ajustes para relacionar o potencial patogênico com os diferentes estágios de desenvolvimento da bactéria.

4 A técnica de isoenzimas não foi eficaz na diferenciação de cepas patogênicas e não patogênicas, contudo foi eficaz na separação entre espécies do mesmo gênero.

5 A técnica de RAPD-PCR foi reprodutível e capaz de caracterizar as estirpes de *Br. laterosporus* com o primer OPA11, além de demonstrar o polimorfismo presente dentro do gênero *Brevibacillus*.

6 A amplificação realizada com o primer BREV, permitiu a autenticação das estirpes do gênero.

7 Através das técnicas de Miniprep e PFGE foi possível determinar o perfil plasmidial das estirpes usadas neste trabalho e compará-las com o potencial patogênico.

8 Sugere-se que a patogenicidade das estirpes testadas de *Br. laterosporus* não está ligada à presença de plasmídeos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park. v. 18, p. 265-266, 1925.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991, 242 p.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998, 574 p.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- APAYDIN, O.; YENIDUNYA, A. F.; HARSA, S.; GUNES, H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 285-292, 2005.
- AZEVEDO, M. O. Centrifugação. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A.; SOUZA, M. T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**, Brasília, DF: UNB, 2003, p. 21-34.
- BAKER, N. F.; FARVER, T. B. Failure of brewer's yeast as a repellent to fleas on dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, p. 212-214, 1983.
- BAPTIST, J. M.; MANDEL, M.; GHERMA, R. L. Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 28, p. 229-244, 1978.
- BARCI, L. A. G.; DE ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C.; ZAPPELINE, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de Isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 7-13, 2009.
- BASIM, E.; BASIM, H. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. **Turkish Journal of Biology**, v. 25, p.405-418, 2001.
- BATTISTI, L.; GREEN, B. D.; THORNE, C. B. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 2, p. 543-550, 1985.
- BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 163-169, 2007.
- BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle Biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico de carrapatos**, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000, cap. 4, p.145-175.

BLAGBURN, B. L.; HENDRIX, C. M.; VAUGHAN, J. L.; LINDSAY, D. S.; BARNETT, S. H. Efficacy of lufenuron against developmental stages of fleas (*Ctenocephalides felis felis*) in dogs housed in simulated home environments. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 464-467, 1995.

BOSSARD, R. L.; HINKLE, N. C.; RUST, M. K. Review of insecticide resistance in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 415-422, 1998.

BOUWMAN, E.; DRIESSEN, W. L.; REEDJIK, J. Model systems for type I copper proteins: structures of copper coordination compounds with thioether and azole-containing ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 104, p. 143-172, 1990.

BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 53-56, 2007.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; PÉREZ-BEDOYA, J. L. Siphonaptera (Pulicidae) in dogs and cats of Colômbia: Clinical and epidemiological aspects. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 353-357, 2010.

CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3057-3061, 1991.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science Technology**, v. 10, n. 3, p. 357-384, 2000.

CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 451-472, 1996

CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Mosquitocidal Toxins: Diversity, Mode of action and Resistance Phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 201-206, 2000.

CHEN, A.; ZHANG, J.; ZHOU, L.; GAO, E. S.; CHEN, L.; ROGAN, W. J. DDT serum concentration and menstruation among young Chinese women. **Environmental Research**, v. 99, n. 3, p. 397-402, 2005.

CHOI, M. J.; BAE, J. Y.; KIM, K. Y.; KANG, H.; CHA, C. J. *Brevibacillus fluminis* sp. Nov., isolated from sediment of estuarine wetland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1595-1599, 2010.

CONNIFF, R. When it comes to pesky fleas, ignorance is bliss. **Smithsonian Magazine**, v. 60, n. 1, p. 76-85, 1995.

COOP, R. L.; TAYLOR, M. A.; JACOBS, D. E.; JACKSON, F. Ectoparasites: recent advances in control. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 55-56, 2002.

CORREIA, T. R.; SOUZA, C. P.; FERNANDES, J. I.; MARTINS, I. V. F.; SANTOS, H. D.; SCOTT, F. B. Ciclo biológico de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera, Pulicidae) a partir de diferentes dietas artificiais. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 5, n. 2, p. 153-160, 2003.

CORREIA, T. R.; CRUZ, V. P.; RIBEIRO, F. A.; MELO R. M. P. S.; FERNANDES, J. I.; VEROCAL, G. G.; SCOTT, F. B. Atividade residual in vitro do pelo de cobertura de cães tratados com Dinotefuran sobre larvas e adultos de *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE) **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 195-199, 2008.

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, p. 807-813, 1998.

DRYDEN, M.W. Biology of fleas of dogs and cats. **Compendium of Continuing Education Practice Veterinary**, v.15, p. 569-579, 1993.

DRYDEN, M.W.; RUST, M. K. The cat flea: biology, ecology and control. **Veterinary Parasitology**, v. 52, p. 1-19, 1994.

DRUCKER, B. J.; KOTTKAMP, W. B. Siphonaptera and the Sanitarian: An Overview of the flea and recommendations for its control. **Journal of Environmental Health**, v. 49, n. 3, p. 154-157, 1986.

ERICKSON, D. L.; JARRETT, C. O.; WREN, B. W.; HINNEBUSCH, B. J. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. **Journal Bacteriology**, v. 188, n. 3, p. 1113-1119, 2006.

FAVRET, M.; YOUNSTEN, A. A. Insecticidal Activity of *Bacillus laterosporus*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 45, p. 195-203, 1985.

FREITAS, F.; MOMEN, H.; SALLES, C. A. The zymovars of *Vibrio cholerae*: multilocus enzyme electrophoresis of *Vibrio cholerae*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 511-516, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.;

MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2002, 920 p.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 3, p. 319-323, 1977.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A. **Handbook of enzyme eletrophoresis in human genetcs**. North-Holland, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1976.

HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTO, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*---One Species on the Basis of Genetic Evidence. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2627-2630, 2000.

HORNOK, S.; MELI, M. L.; PERRETEN, A.; FARKAS, R.; WILLI, B.; BEUGNET, F.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 98-104, 2010.

HOWELL, J. M.; UETI, M. W.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Transovarial Transmission Efficiency of *Babesia bovis* ticks stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 426-431, 2007.

IBARGUTXI, M. A.; ESTELA, A.; FERRE, J.; CABALLERO, P. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 437-444, 2006.

JACOBS, D. E.; HUTCHINSON, M. J.; RYAN, W. G. Control of flea populations in a simulated home environment model using lufenuron, imidacloprid or fipronil. **Medicine and Veterinary Entomology**, v. 15, n. 1, p. 73-77, 2001.

KADO, C. I.; LIU, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 145, n. 3, p. 1365-1373, 1981.

KOEHLER, P. G.; MILIA, J.; PATTERSON, R. S. Residual Efficacy of Insecticides Applied to Carpet for Control of Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 4, p. 1036-1038, 1986.

KUMAR, D.; CHAUDHARY, K.; BOORA, K. S. Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains by PCR-RAPD based fingerprinting. **Indian Journal of Microbiology** v. 50, p. 27-32, 2010.

LAPPIN, M. R.; HAWLEY, J. Presence of *Bartonella* species and *Rickettsia* species DNA in the blood, oral cavity, skin and claw beds of cats in the United States. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 509-514, 2009.

LAUBACH, A. C. Studies on aerobic, spore bearing, non-pathogenic bacteria. Spore bearing organisms in water. **Journal of Bacteriology**, v. 1, p. 505-512, 1916.

LÁZARO, N. S.; TIBANA, A.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; QUINTAES, B. R.; HOFER, E. Padrão de susceptibilidade a antimicrobianos e perfil plasmidial em *Salmonella muenster* isoladas dos suínos e do ambiente de abatedouros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 65-70, 2004.

LEEMON, D. M.; TURNER, L. B.; JONSSON, N. N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 248–260, 2008.

LINARDI, P. M.; DE MÁRIA, M.; BOTELHO, J. R. Effects of Larval Nutrition on the Postembryonic Development of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 494-497, 1997.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000, 291p.

LINARDI, P.M. Biologia e epidemiologia das pulgas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 103-106, 2004.

LITAIFF, E. C.; TADEI, W. P.; PORTO, I. R.; OLIVEIRA, M. A. Analysis of toxicity on *Bacillus sphaericus* from amazonian soils to *Anopheles darlingi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. **Acta Amazonica**, v. 38 n. 2, p. 255-262, 2008.

LOGAN, N. A.; FORSYTH, G.; LEBBE, L.; GORIS, J.; HEYNDRICKX, M.; BALCAEN, A.; VERHELST, A.; FALSEN, E.; LJUNGH, A.; HANSSON, H. B.; DE VOS, P. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 953–966, 2002.

LOMHOLT, J. A.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6284–6295, 2001.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; PÉREZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MALOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBIT, R. D. Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 153-164, 1993.

MARCHIONDO, A. A. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 332-344, 2007.

MASSOCHIN, L. N. P.; FIUZA, L. M. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 3, p. 159-168, 2008.

McELROY, K. M.; BLAGBURN, B. L.; BREITSCHWERDT, E. B.; MEAD, P. S.; McQUISTON, J. H. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 197-204, 2010.

McTIER, T. L.; EVANS, N. A.; MARTIN-SHORT, M.; GRATION, K. Comparison of the activity of selamectin, fipronil, and imidacloprid against flea larvae (*Ctenocephalides felis felis*) in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 45-50, 2003.

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; Rosana FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, 2005.

MEHLHORN, H.; MENCKE, N.; HANSEN O. Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light- and electron-microscopy study. **Parasitology Research**, v. 85, p. 625-637, 1999.

MEIRELLES, F. P.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M. C. G.; GONÇALVES, V. D.; BRUM, P. R.; CASTRO, E. A. R.; PEREIRA, A. A.; ESTEVES, F. A.; PEREIRA, J. A. A. Aspectos ecológicos da resistência antimicrobiana de bactérias de importância em infecção humana. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 287-293, 2002.

MELO, D. R.; CRUZ, G. B.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 166-170, 2007.

METZGER, M.E.; RUST, M.K. Effect of temperature on cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) development and overwintering. **Journal of Medical Entomology**, v. 34, p. 173-178, 1997.

MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (St Louis, MO, US). Mark J Rugar, William P Donovan, Yping Tan, Annette C Slaney. **Bacillus thuringiensis CRYET29 compositions toxic to coleopteran insects and Ctenocephalides spp.** US006537756B1, 6 julho 2000, 25 março 2003.

MONTALDI, F. A.; ROTH, I. L. Parasporal Bodies of *Bacillus laterosporus* Sporangia. **Journal Bacteriology**, v. 172, n. 21, p. 2168-2171, 1990.

MOORE, J. E.; GILPIN, D.; CROTHERS, E.; CANNEY, A.; KANEKO, A.; MATSUDA, M. Occurrence of *Campylobacter* *Campylobacter spp.* and *Cryptosporidium* *Cryptosporidium spp.* in seagulls (*LarusLarus spp.*). **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 2, p. 111-114, 2002.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, p. 509-539.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

MYCOGEN CORPORATION (Indianapolis, IN). H. E. Schnepf.; K. E. Narva.; B. A. Stockhoff.; S. F. Lee.; M. Walz.; B. Sturgis. **Pesticidal toxins and genes from *Bacillus laterosporus* strains**. US6605701B2, 28 setembro 2001, 12 agosto 2003.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661–1669, 1999.

OLIVEIRA, E. J. ***Brevibacillus laterosporus*: caracterização, estudo da diversidade genética e sensibilidade de alguns insetos e molusco**. 2003. 113f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2003.

OLIVEIRA, E. J.; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R. G.; PASSOS, L. K. J.; ZAHNER, V. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its Potential use in Biological control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6657-6664, 2004.

OLIVEIRA, C. D.; TADEI, W. P. Observação da sintomatologia em larvas de *Anopheles albitarsis* (Lynch-Arribalzaga, 1878), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em contato com *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904). In: CONGRESSO INTERNACIONAL PIATAM, 1., 2005, Manaus. **Ambiente, homem, gás e petróleo**. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2005, v. 1, p. 275-275.

OLIVEIRA, C. D.; TADEI, W. P.; ABDALLA, F. C. Estudo histopatológicos de larvas de *Anopheles albitarsis* (Lynch-Arribalzaga, 1878), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em contato com *Bacillus sphaerius* (Neide, 1904). In: 1º CONGRESSO INTERNACIONAL PIATAM, 1., 2005, Manaus. **Ambiente, Homem, Gás e Petróleo**. Manaus: EDUA, Amazonas, 2005, v.1, p. 268.

O'REILLY, A. O.; KHAMBAY, B. P. S.; WILLIAMSON, M. S.; FIELD, L. M.; WALLACE, B. A.; DAVIES, T. G. E. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. **Biochemical Journal**, v. 396, p. 255 – 263, 2006.

- PANNUCCI, J.; OKINAKA, R. T.; SABIN, R.; KUSKE, C. R. *Bacillus anthracis* pX01 Plasmid Sequence Conservation among Closely Related Bacterial Species. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 134-141, 2002.
- PARVEZ, N.; CORNELIUS, L. K.; FADER, R. *Brevibacillus brevis* Peritonitis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 337, n. 4, p. 297-299, 2009.
- PEREIRA, M. C.; SANTOS, A. P. *Ctenocephalides felis felis*: biologia, ecologia e controle integrado – Parte 1 (Biologia ecologia). **Clínica Veterinária**, n. 16, p. 34-38, 1998.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.
- POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U. R.; OLIVEIRA, R. G. S.; ANDRADE, G. S. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, p. 233-239, 2006.
- POLANCZYK, R. A.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2008. p.111-136.
- PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 419-432, 2003.
- PULLEN, S. R.; MEOLA, R. W. Survival and reproduction of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) fed human blood on an artificial membrane system. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, p. 467-470, 1995.
- RAI, T.; DUTTA, I.; SAHA, P.; DAS, S.; ROY, S. C. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 85, p. 11-21, 2006.
- RAIL, C. D.; HANNA, T. L.; MOORE, W. R. Plaque. A growing concern. **Journal of Environmental Health**, v. 42, n. 1, p. 315-319, 1980.
- RAO, D. R.; MANI, T. R.; RAJENDRAN, R.; JOSEPH, A. S.; GAJANANA, A.; REUBEN, R. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi Índia. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, p. 1-5, 1995.
- REGIS, L.; SILVA, S. B.; MELO-SANTOS, M. A. V. The use of Bacterial Larvicides in mosquito and Black fly Control Programmes in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 207-210, 2000.
- RÉGUA-MANGIA, A.H.; GOMES, T. A. T.; ANDRADE, J. R. C.; VIEIRA, M. A. M.; GONZALEZ, A. G. M.; ZAHNER, V.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Genetic analysis of

Escherichia coli strains carrying enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) markers, isolated from children in Rio de Janeiro city, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 38-41, 2003.

REYES-RAMÍREZ, A.; IBARRA, J. E. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 125-129, 2008.

RIVERS, D. B.; VANN, C. N.; ZIMMACK, H. L.; DEAN D. H. Mosquitocidal Activity of *Bacillus laterosporus*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 444-447, 1991.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; D' AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.

ROLLE, R. L.; EJIOFOR, A. O.; JOHNSON, T. L. Determination of the plasmid size and location of endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 580-585, 2005.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, p. 174-179, 1993.

RUIU, L.; DELRIO, G.; ELLAR, D. J.; FLORIS, I.; PAGLIETTI, B.; RUBINO, S.; SATTA, A. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). **Entomologia Experimentalis et applicata**, v. 118, p. 137-144, 2006.

RUIU, L.; FLORIS, I.; SATTA, A.; ELLAR, D. J. Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystal against *Musca domestica* e *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 43, p. 136-143, 2007.

RUIU, L.; SATTA, A.; FLORIS, I. Immature housefly (*Musca domestica*) control in breeding sites with a new *Brevibacillus laterosporus* formulation. **Environmental Entomology**, v. 37, n. 2, p. 505-509, 2008.

RUST, M. K.; DRYNDEN, M. W. The biology, ecology and management of the cat fleas. **Annual Review Entomology**, v. 42, n. 1, p. 451-473, 1997.

RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat fleas) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 232-236, 2005.

SAIKIA, R.; GODOI, D. K.; MAZUMDER, S.; YADAV, A.; SARMA, R. K.; BORA, T. C.; GODOI, B. K. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India. **Microbiological Research**, v. 166, n. 3, p. 216-225, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 608p.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte, MG: FEPMVZ, 2002, 265p.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 93-97, 1982.

SANCHIS, V.; GOHAR, M.; CHAUFAX, J.; ARANTES, O.; MÉIER, A.; AGAISSE, H.; CAYLEY, J.; LERECLUS, D. Development and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater potency and UV resistance. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4032-4039, 1999.

SAVIO, G. M.; PINOTTI, E. B. **Controle Biológico da Lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *Baculovirus anticarsia***. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, ano 7, n. 13, junho 2008. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/agro13/artigos/AnoVII-Edic13-Art04.pdf>> Acesso em: 15 set. 2010, 18:35:40.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 873-884, 1986.

SHAW, S. E.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 183-188, 2004.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; KOMAGATA, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 939-946, 1996.

SILVA, K. R. A.; MEIRELLES, M. N. S. L.; RABINOVITCH, L. Ultrastructural and entomotoxic aspects of *Bacillus sphaericus* strains isolated from brazilian soils. **Israel Journal of Entomology**, v. 22, p. 147-154, 1998.

SILVA, S. F.; DIAS, D. G. S.; MARTINS, E. S. M.; SOARES, C. M. S.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus sphaericus* tóxicas contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, EMBRAPA, Brasília, DF, n.31, p. 4-23, 2002.

SILVA, H. C.; VERONEZ, V. A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PRETTE, N.; BORGES, F. A.; MIYASAKA, D. S.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Implantação de colônia de *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) e determinação do período de desenvolvimento dos estágios imaturos sob condições controladas. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 4, n. 3, 2008.

SILVEIRA, W. D.; BENETTI, F.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, A.; SOLFERINI, V. N.; BROCCHI, M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 6, p. 303-310, 2001.

SILVERMAN, J.; RUST, M.K.; REIERSON, D. A. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, p. 78-83, 1981.

SINGER, S. Potential of *Bacillus sphaericus* and related spore-forming bacteria for pest control. In: BURGESS, M. D. **Microbiol Control of Pests and Plant Diseases**, New York: Academic Press, 1981, p. 283-292.

SINGER, S. The utility of strains of morphological group II Bacillus. **Advances in Applied Microbiology**, v. 42, p. 219-261, 1996.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**, San Francisco: W.H. Freeman, 1973, 573p.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043–1047, 2002.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 415-426, 1991a.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. **Gene**, v. 170, p. 85–89, 1996.

VAN DER AUWERA, G. A.; TIMMERY, S.; HOTON, F.; MAHILLON, J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. **International Journal Food Microbiology**, v. 25, p. 164–172, 2007.

VAN DRIESCHE, R. G.; BELLOWS, J. T. S. **Biological Control**. New York: Chapman and Hall Press, 1996, 539 p.

VIEIRA, F. C. S; NAHAS, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 539-545, 2000.

VIEIRA, V. P. C.; FAZIO, P. I. Jr.; VEROCAI, G. G.; CORREIA, T. R.; SCOTT, F. B. Evaluation of different meridic diets upon adult emergence of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 65-67, 2010.

VILLAS BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H.; MACEDO, N. Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 71-79, 2002.

WALISZEWSKI, S. M.; LANFANZON, R. M.; HART, M. M. Difference in persistent organochloride pesticides concentration between breast adipose tissue and blood serum. **Journal Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 70, p. 920-926, 2003.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, p. 937-947, 2005.

WANG, J.; HADDAD, N. I. A.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Structural Characterization of Lipopeptides from *Brevibacillus brevis* HOB1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 812-821, 2010.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOLFF, M. S.; TONIOLO, P.G.; LEE, E.W.; RIVERA, M.; DUBIN, N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 8, p. 648-652, 1993.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000, p. 81-100.

ZAHNER, V.; MOMEN, H.; RABINOVITCH, L. A Comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *thuringiensis*. **Journal Applied Bacteriology**, v. 67, p. 275-282, 1989.

ZAHNER, V. **Análise isoenzimática de algumas espécies entomopatogênicas de Bacillus**. 1992. 132f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1992.

ZAHNER, V.; RABINOVITCH, L.; CAVADOS, C. F. G.; MOMEN, H. Multilocus enzyme electrophoresis on agarose gel as an aid to the identification of entomopathogenic *Bacillus sphaericus*. **Journal Applied Bacteriology**, v. 76, p. 327-335, 1994.

ZAHNER, V.; HOMEN, H. Multilocus enzyme electrophoresis study of *Bacillus sphaericus*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 65-68, 1995.

ZAHNER, V. **Aplicação de métodos moleculares no estudo da variação intraespecífica em *Bacillus entomopatogênicos: Bacillus sphaericus e Bacillus laterosporus***. 1998. 77f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1998.

ZAHNER, V.; RABINOVITCH, L.; MOMEN, H. Genetic Diversity Among *Brevibacillus laterosporus* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 5182-5185, 1999.