



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA DE SOUZA PERUCA

**DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE
POPULAÇÕES SIMPÁTRICAS DE *Bacillus cereus* E *Bacillus*
thuringiensis PELO PERFIL DE REP-PCR**

MESTRADO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Londrina
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Embrapa Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ANA PAULA DE SOUZA PERUCA

**DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE
POPULAÇÕES SIMPÁTRICAS DE *Bacillus cereus* E *Bacillus
thuringiensis* PELO PERFIL DE REP-PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Olivia Marcia Nagy Arantes.

Co-orientadora: Dr^a Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas.

Londrina
2005

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Catalogação na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

P471d Peruca, Ana Paula de Souza
Determinação das relações genéticas entre populações
simpátricas de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*
pelo perfil de REP-PCR / Ana Paula de Souza Peruca. –
Londrina, 2005.
125f. : il.

Orientador: Olivia Marcia Nagy Arantes.
Co-orientador: Gislayne F. L. Trindade Vilas-Bôas.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) –
Universidade Estadual de Londrina, 2005.
Inclui bibliografias.

1. Bactérias gram-positivas – Teses. 2. Bacillus (Bactéria)
– Teses. 3. Biologia molecular – Teses. 4. Genética molecular
– Teses. I. Arantes, Olivia Marcia Nagy. II. Vilas-Bôas, Gislayne
F. L. Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. IV. Título.

CDU 577.2
579.86
579.85

ANA PAULA DE SOUZA PERUCA

**DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE
POPULAÇÕES SIMPÁTRICAS DE *Bacillus cereus* E *Bacillus
thuringiensis* PELO PERFIL DE REP-PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Olivia Marcia Nagy Arantes
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Laurival Antonio Vilas-Bôas
Instituto Agronômico do Paraná/IAPAR

Dr. Leon Rabinovitch
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Londrina, 4 de julho de 2005.

A Deus, por me permitir dar mais este passo e pela confortável ciência de que o Senhor sempre está ao meu lado em todos os momentos, não me deixando esquecer que Ele é supremo no controle de todas as coisas.

Aos meus amados pais, Antonio e Márcia, por todos os anos de amor, paciência, encorajamento e carinho incondicionais. A vocês, que com certeza são meus maiores exemplos de honestidade, responsabilidade, perseverança e fé, todo o meu amor.

Aos meus queridos irmãos, Marcos e Erika, por todas as palavras de amor e incentivo, mesmo que por telefone, sempre me confortavam nas horas certas.

Ao meu amor, Rogério Luís Alves Souza, por estar ao meu lado, cercando-me de carinho e compreensão. Por ser meu companheiro e confidente, sempre me apoiando em todos os momentos.

A todos, com muito amor e os meus sinceros sentimentos de gratidão.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª **Olivia Marcia Nagy Arantes**, por estar ao meu lado com dedicação e paciência me ensinando lições de ciência e ética, permitindo-me crescer pessoal e profissionalmente.

À Drª **Gislayne F. L. Trindade Vilas-Bôas**, por estar ao meu lado como amiga, irmã e orientadora, guiando-me para ser uma boa profissional. Por ser parte imprescindível na realização deste sonho e por ter investido seu amor, seu tempo, seus conhecimentos e sua paciência em mim.

À profª Drª **Maria Helena Pelegrinelli Fungaro**, por ceder gentilmente tempo, paciência e aparelhos indispensáveis à realização deste trabalho.

À profª Drª **Leda Maria K. Sodré**, por permitir a utilização de seu laboratório durante as fases de otimização deste experimento e pelas valiosas sugestões.

À profª Drª **Marilda Vidotto**, por também permitir com tanta boa vontade a utilização de aparelhos necessários durante este trabalho.

À profª Drª **Márcia Cristina Furlaneto**, pela autorização da utilização de equipamentos necessários à realização deste experimento.

À **Iliana Del Rocio Alcocer Negrete**, pela prestatividade e imensa boa vontade em compartilhar informações importantíssimas, que ajudaram a solucionar alguns problemas.

Ao Dr. **Laurival Antônio Vilas-Bôas**, pelas valiosas sugestões e informações fornecidas durante este trabalho e pelo incentivo nos momentos de maior dificuldade.

Ao Dr. **José Eduardo Garcia**, por ajudar cedendo gentilmente reagentes e equipamentos, e pela amizade.

Ao Dr. **Leon Rabinovitch**, pelos esclarecimentos e pelas sugestões dados a este trabalho que contribuíram para o seu aperfeiçoamento.

Ao amigo **João Godoy**, pela agradável companhia e grande ajuda técnica, pelos momentos de descontração e apoio durante todo este trabalho.

Aos queridos amigos de laboratório: **Elisangela, Karen e Clelton**, por serem meus companheiros e pessoas maravilhosas, por todos os momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos da faculdade: **Magda, Cleide, Fabi, Vivian, Fabrine, Cláu, Fram, Horácio, Corina, Mani, Rodrigo Juliano, Gustavo, Eduardo, Dalton, Lorraine, Nelci, Tati, Renata, Ronaldo, Sandra, Viviani, Dani, Maria Paula, Andréa, Thiago, Rubens e Ivan**, pelo carinho, pela compreensão, força e paciência compartilhada durante estes meses de estudo.

À querida **Sueli**, secretária do nosso mestrado, por sempre atender-nos com alegria e disposição.

Aos que não fizeram parte do mestrado, mas estiveram presentes com muito amor e carinho, incentivando e compartilhando minhas alegrias e tristezas durante estes dois anos: **Alécio e Ana Luiza, Michelly e Alexandre e Jenifer**.

Ao senhor **Belmiro** e a **Dionésia**, por me acolherem em sua família dando-me o privilégio de ser tratada como uma filha.

À **CAPES** e à **CNPq**, pelo apoio financeiro concedido para execução deste trabalho.

PERUCA, Ana Paula de S. **Determinação das relações genéticas entre populações simpátricas de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.** 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

As espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis* apresentam impactos diferentes na atividade humana, sendo a primeira um comum contaminante de alimentos e a segunda, um importante agente no controle biológico de insetos. Estas espécies têm uma grande similaridade genética. Usando os conceitos de sistemática bacteriana, uma atenção especial deveria ser devotada também à ecologia e à genética das populações dessas espécies, visando uma melhor definição destes *taxa*. Neste sentido, este trabalho estuda a similaridade genética e a estrutura populacional de populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR. A formação das populações simpátricas destas duas espécies foi feita a partir de seis amostras de solos de duas áreas distintas, uma área de mata (Horto Florestal da UEL/Londrina-PR), chamada de área M, e uma área de pastagem (Fazenda São João/Londrina-PR), chamada área P, as quais distavam 5 Km uma da outra. Três destas amostras de solos foram coletadas aleatoriamente em 100 m² da área de mata (M7, M8 e M9) e outras três amostras foram igualmente coletadas em 100 m² da área de pastagem (P1, P3 e P5), destas seis amostras foram selecionadas 117 linhagens (60 linhagens de *B. thuringiensis* e 57 linhagens de *B. cereus*). Para eliminar da amostragem prováveis linhagens de *Bacillus anthracis*, todas as linhagens foram testadas quanto à resistência ao antibiótico ampicilina, sendo quatro linhagens de *B. thuringiensis* (23, 56, 57, 58) e uma de *B. cereus* (85) caracterizadas como sensíveis. A linhagem 85 não foi utilizada para a caracterização genética. Para a caracterização pelo perfil de REP-PCR extraíram-se os DNA genômicos das 116 linhagens e procedeu-se a amplificação das regiões genômicas presentes entre duas repetições das seqüências REP. As bandas de DNA amplificadas para cada linhagem foram utilizadas para a construção de uma matriz binária de presença e ausência. A similaridade genética entre as linhagens foi calculada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e o agrupamento entre as mesmas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means*) através do programa de computador NTSYS-PC. O índice da presença das duas espécies é similar dentro de cada área (mata e pastagem), com a área de mata apresentando menor índice da presença para ambas as espécies. As 60 linhagens de *B. thuringiensis* compõem quatro tipos eletroforéticos (ETs) e as 56 linhagens de *B. cereus* compõem 38 ETs. A análise dos perfis de REP-PCR revela que para cada uma das áreas a estrutura genética das populações de *B. thuringiensis* tende à clonalidade e a estrutura genética das populações de *B. cereus* tende a ser panmítica ou epidêmica. O conjunto de dados dos ETs representativos de *B. cereus* e *B. thuringiensis* não aponta para uma clara distinção entre estas duas espécies. No entanto, a análise da estrutura genética das populações nas diferentes áreas de coleta indica que elas devem permanecer como unidades taxonômicas separadas.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*; *Bacillus thuringiensis*; REP-PCR; taxonomia; sistemática.

PERUCA, Ana Paula de S. **Genetic relationship between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* by REP-PCR genomic fingerprinting.** 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

B. cereus and *B. thuringiensis* present different impacts on human activity, being the former a common contamination of foods and the latter, an important agent for biological control of insects. These species have great genetic similarity. Using the concepts of the bacterial systematics, special attention should be given to ecology and genetics of populations of these species for a better definition of these *taxa*. In this sense, this work shows the genetic similarity and populational structure of sympatric populations of *B. cereus* and *B. thuringiensis* by profile of REP-PCR. The formation of sympatric populations of these two species was made out of six samples of soil from two distinct areas, one of forest (Horto Florestal of UEL/Londrina-PR), here in called area M, and the other of agricultural land (Fazenda São João/Londrina-PR), called area P, both 5 km away from each other. Three of these samples were collected at random in 100 m² of the forest (M7, M8, and M9 and the other three were collected in 100 m² of agricultural land (P1, P2 and P3). From these six samples, 117 strains were selected (60 strains of *B. thuringiensis* and 57 strains of *B. cereus*). In order to eliminate from the sample probable strains of *Bacillus anthracis*, all the strains were tested for resistance to ampiciline antibiotics. Four strains of *B. thuringiensis* (23, 56, 57, 58) and one of *B. cereus* (85) were characterized as sensitive. Strain 85 was not used for genetic characterization. For the characterization of the profile of REP-PCR, extraction of genomic DNA from 116 strains and the amplification of the genomic regions present between two repetitions of REP sequences were made. The amplified DNA bands for each strain were used for the construction of a binary matrix of presence and absence of bands. The genetic similarity between the strains was estimated by coefficient of Jaccard and grouping by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means using NTSYS-PC computer program. The index for the presence of both species is similar within each area (forest and agricultural land) the former having the lowest index of presence for both species. The 60 strains of *B. thuringiensis* account for four electrophoresic types (ETs) and the 56 strains of *B. cereus*, for 38 ETs. The analysis of the profiles of REP-PCR shows that for each one of the areas the structural genetics of the *B. thuringiensis* populations tend to clonality and the genetic structure of the *B. cereus* populations tend to be panmitic or epidemic. The set of data of the ETs representative of *B. cereus* and *B. thuringiensis* does not provide a clear distinction between these two species. Nevertheless, the analysis of the genetic structure of the populations in the different areas of collection indicates that they remain as separate taxonomic units.

Key words: *Bacillus cereus*; *Bacillus thuringiensis*; REP-PCR; taxonomy; systematic.

LISTA DE FIGURAS

3. ARTIGO 1: Determinação das relações genéticas entre populações simpátricas de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.

Legendas das figuras.....62

Figura 1. a) Perfis do DNA das linhagens de *B. thuringiensis* amplificadas pelos iniciadores REP1R-I e REP2-I, em gel de agarose 2,0%; b) Perfis do DNA das linhagens de *B. cereus* amplificadas pelos iniciadores REP1R-I e REP2-I, em gel de agarose 2,0%; os números das canaletas equivalem aos isolados de *B. thuringiensis* e *B. cereus*; canaletas: (CN) controle negativo; (M) padrão de tamanho de bandas de DNA (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen; Carlsbad, California).....63

Figura 2. Dendrograma de similaridade genética entre os 42 ETs identificados (4 de *B. thuringiensis* e 38 de *B. cereus*). O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA a partir de uma matriz de coeficientes de similaridade genética obtida pelo algoritmo de Jaccard. (Δ) *B. thuringiensis* de mata, (\blacktriangle) *B. thuringiensis* de pastagem, (\circ) *B. cereus* de mata e (\bullet) *B. cereus* de pastagem. As setas indicam os quatro ETs observados nos 60 isolados de *B. thuringiensis*.....64

Figura 3. Dendrograma de similaridade genética entre as linhagens de *B. thuringiensis* (1-30) e de *B. cereus* (61-88), provenientes da área de mata. O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA a partir de uma matriz de coeficientes de similaridade genética obtida pelo algoritmo de Jaccard. Grupo I representa todas as linhagens de *B. thuringiensis* e quatro linhagens de *B. cereus*. Grupo II representa apenas linhagens de *B. cereus*.....65

Figura 4. Dendrograma de similaridade genética entre as linhagens de *B. thuringiensis* (31-60) e de *B. cereus* (89-117), provenientes da área de pastagem. O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA a partir de uma matriz de coeficientes de similaridade genética obtida pelo algoritmo de Jaccard. Grupo I representa as linhagens de *B. thuringiensis* e três linhagens de *B. cereus* (91, 92 e 101). Grupo II representa as linhagens de *B. cereus* e uma linhagem de *B. thuringiensis* (52).....66

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1. Características dos dois tipos de doenças causadas por *Bacillus cereus*.....15

Tabela 2. Algumas características básicas para a identificação das espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis*.....34

2. ARTIGO 1: Determinação das relações genéticas entre populações simpátricas de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.

Tabela 1. Distribuição das 57 linhagens de *B. cereus* e das 60 linhagens de *B. thuringiensis* isoladas nas áreas de mata (Horto Florestal da UEL) e pastagem (Fazenda São João) localizadas em Londrina/PR, Brasil.....60

Tabela 2. Número total de colônias analisadas e índice da presença de *B. cereus* e *B. thuringiensis* nas seis amostras de solo provenientes das áreas de mata (M7, M8 e M9) e pastagem (P1, P3 e P5). O índice da presença é calculado pela razão entre número de colônias indetificadas e o total de colônias analisadas para cada amostra de solo.....60

Tabela 3. Distribuição dos ETs encontrados entre as 60 linhagens de *B. thuringiensis** e as 56 linhagens de *B. cereus*† provenientes das áreas de mata e pastagem.....61

3. ARTIGO 2: Biologia e taxonomia de *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis*.

Table 1. Characteristics of the two types of disease caused by *Bacillus cereus* (from Granum, 2002).....103

Table 2. A few basic characteristics for the identification of species of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*.....104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>B. cereus</i>: A ESPÉCIE MODELO	13
1.2. <i>B. thuringiensis</i>: CARACTERÍSTICAS E EMPREGO BIOTECNOLÓGICO	20
1.3. TAXONOMIA DO GRUPO DO <i>B. cereus</i>	27
1.4. O USO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA REPETITIVO EM ANÁLISES GENÉTICAS	36
1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
2. OBJETIVOS	43
3. ARTIGO 1: DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES SIMPÁTRICAS DE <i>Bacillus cereus</i> E <i>Bacillus thuringiensis</i> PELO PERFIL DE REP-PCR.	44
4. ARTIGO 2: BIOLOGY AND TAXONOMY OF <i>Bacillus cereus</i>, <i>Bacillus anthracis</i> AND <i>Bacillus thuringiensis</i>.	67
5. REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

A despeito do grande avanço da biologia molecular devido à introdução de novas ferramentas para as análises genéticas, a sistemática de bactérias ainda não chegou a um consenso para a definição da “unidade fundamental da diversidade biológica”, ou seja, ao conceito de espécie.

Para os taxonomistas que trabalham com organismos superiores como plantas e animais, o conceito de espécie tem mudado com o tempo. Inicialmente, espécies eram identificadas como um agrupamento de organismos com características fenotípicas similares, particularmente morfológicas. Esse conceito foi evoluindo para a visão de que uma espécie nada mais é do que um conjunto de organismos similares, vistos como a unidade fundamental da ecologia e da evolução (COHAN, 2002). Segundo o atual conceito biológico mais aceito, espécie é uma unidade taxonômica formada por agrupamentos de populações naturais intercruzantes, reprodutivamente isoladas de outros grupos (MAYR, 1996). No sentido biológico básico, uma espécie é uma constituição genômica protegida, ou seja, uma população que desenvolveu adaptações e mecanismos de isolamento para proteger seu patrimônio gênico da introdução de genes de outros organismos.

O conceito que tem sido adotado em sistemática de bactérias tem origem naquele aplicado aos organismos superiores. Por isso, as bactérias foram inicialmente classificadas utilizando características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e sorológicas. Posteriormente, com o advento das técnicas de biologia molecular no início dos anos 70, os dados moleculares começaram a ser usados na classificação de bactérias. Inicialmente, a hibridação de DNA foi o método determinado como padrão, sendo necessário um nível de no

mínimo 70% de hibridação entre os genomas para se determinar que duas bactérias pudessem ser consideradas como pertencentes à mesma espécie. Atualmente, tem sido utilizado, além deste método, a comparação das seqüências de nucleotídeos dos genes que codificam para o RNAr 16S para a demarcação de espécies, onde uma divergência maior que 3% caracteriza duas bactérias como espécies diferentes (COHAN, 2002). Estes genes são aceitos como “relógio molecular” por causa de sua presença universal e por serem constantemente funcionais, mostrando uma estrutura composta de regiões conservadas e variáveis (WOESE, 1987).

Com todas estas mudanças, a classificação de diferentes espécies de inúmeros grupos de bactérias vem mudando de uma forma muito dinâmica. Assim acontece com o grupo do *Bacillus cereus*, o qual é composto por seis espécies altamente relacionadas, *B. cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* e *Bacillus weihenstephanensis*. Assim, trabalhos recentes têm sugerido que *B. cereus stricto sensu*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* deveriam ser considerados como membros de uma única espécie, *B. cereus lato sensu* (BAVYKIN et al., 2004; DAFFONCHIO; CHERIF; BORIN, 2000; HELGASON et al., 2000a; HELGASON et al., 2000b). No entanto, outros estudos têm obtido a discriminação entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* (CHERIF et al., 2003; VILAS-BÔAS et al., 2002) e entre *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (CHANG et al., 2003; HARREL; ANDERSEN; WILSON, 1995; KEIM et al., 1997; RADNEDGE et al., 2003).

Inicialmente, estas espécies foram classificadas como distintas devido à importância de suas diferenças fenotípicas, as quais formam a base para a sua classificação. Assim, as células de *B. anthracis* apresentam a formação de cápsula e produzem toxinas que levam ao carbúnculo hemático em animais e pessoas, doença também chamada antrax. As células de *B. thuringiensis* formam um cristal parasporal que tem atividade em larvas de

várias ordens de insetos, permitindo o uso de produtos à base desta bactéria para o controle biológico de alguns insetos. Enquanto que as células de *B. cereus* são desprovidas destes dois fenótipos e podem causar contaminação alimentar. Contudo, a comparação das seqüências de nucleotídeo do DNAr 16S destas espécies apresentaram menos que 1% de divergência entre elas (ASH et al., 1991a). No entanto, um mínimo de 3% de divergência é recomendado como critério conservativo para a demarcação de espécies e sustentar a proposição de espécies separadas. Conseqüentemente, as seqüências de DNAr 16S e as características fenotípicas são alguns dos principais fatores que dão origem às discussões filogenéticas sobre a classificação destas espécies.

Nos próximos tópicos, as características microbiológicas, bioquímicas e genéticas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* são revisadas junto com a discussão dos mais recentes avanços quanto à compreensão das relações taxonômicas dentro deste grupo de bactérias.

Na segunda parte é apresentado um artigo referente ao estudo da similaridade genética e a estrutura populacional de populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*. A terceira parte é composta por um artigo contendo uma completa revisão sobre *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*, bem como as discussões taxonômicas que permeiam esse grupo de bactérias.

1.1. *B. cereus*: A ESPÉCIE MODELO

B. cereus é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, móvel pela presença de flagelos peritríquios, aeróbia, anaeróbia facultativa, mesófila com temperatura de

crecimento variando entre 10°C e 48°C, mas com crescimento ótimo entre 28°C e 35°C. É uma espécie cosmopolita, sendo considerada como saprófita de solo, mas também encontrada em alimentos de origem animal e vegetal (RABINOVITCH et al., 1985), particularmente em produtos lácteos (GRANUM e BAIRD-PARKER, 2000). As colônias desta espécie podem ser identificadas por apresentarem forma irregular, esbranquiçadas e geralmente brilhantes, utilizarem a glicose como fonte de carbono, mas não o manitol, nem a arabinose e a xilose, hidrolisarem amido e gelatina, apresentarem atividade hemolítica, serem resistentes a ampicilina e mostrarem grande atividade de lecitinase (SCHRAFT e GRIFFITHS, 1995).

A capacidade desta espécie se multiplicar em alimentos, independente da presença ou ausência de microrganismos endógenos (SILVA; RABINOVITCH; ROBBS, 1993), causa sérios problemas à indústria de produtos alimentícios, especialmente à de produtos lácteos. A presença desta bactéria pode causar alterações na textura e, ou, no odor do alimento pela multiplicação de células vegetativas ou pela produção de toxinas. O resultado final deste processo é a contaminação alimentar, que pode provocar vômitos ou diarreias no organismo humano, e raramente com ambos os episódios. Estes sintomas podem ser iniciados poucas horas após a ingestão do alimento, dependendo do tipo de toxinas ingeridas, se eméticas (produzidas pela multiplicação das células no alimento) ou diarréicas (produzidas durante a multiplicação das células de *B. cereus* no intestino delgado) (GRANUM e LUND, 1997). A Tabela 1 descreve algumas das características da contaminação alimentar por *B. cereus*.

B. cereus é um organismo comum em contaminação alimentar, mas, ocasionalmente, também está relacionado a infecções sistêmicas e locais, especialmente associado a pacientes comprometidos imunologicamente, neonatos e usuários de drogas (KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000). Por exemplo, *B. cereus* é responsável por uma severa forma de endoftalmite, a qual pode resultar em perda parcial da

visão ou até mesmo cegueira (CALLEGAN et al., 2002), bacteremia (GINSBURG et al., 2003; HILLIARD; SCHELONKA; WAITES, 2003), meningites, pneumonia, infecções do trato urinário e falência fulminante do fígado (revisado em KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000).

Tabela 1. Características dos dois tipos de doenças causadas por *Bacillus cereus*.

	Síndrome Diarréica	Síndrome Emética
Dose de infecção	10^5 - 10^7 (total)	10^5 - 10^8 células por grama de alimento para produzir toxina emética suficiente
Local de produção da toxina	No intestino delgado do hospedeiro	Formada nos alimentos
Tipo de toxina	Proteína (s)	Peptídeo Cíclico
Período de incubação	8-16 h (ocasionalmente > 24 h)	0.5-5 h
Duração da doença	12-24 h (ocasionalmente vários dias)	6-24 h
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa, (ocasionalmente diarreia sanguinolenta), às vezes com náusea	Náusea, vômito e enjôo (às vezes seguidos por diarreia, devido à produção adicional de enterotoxina?)
Alimentos mais frequentemente contaminados	Produtos à base de carne, sopas, vegetais, pudins/molhos e leite/produtos lácteos	Arroz reaquecido várias vezes, macarrão e alimentos prontos

Fonte: Granum, 2002.

As linhagens de *B. cereus* secretam uma bateria de enzimas extracelulares e toxinas que são supostamente importantes fatores para a sua patogenicidade. Duas enterotoxinas formadas por três componentes, HBL e NHE, são atualmente consideradas como causadoras das infecções diarréicas por contaminação alimentar devido a *B. cereus*. As atividades hemolítica, citotóxica e dermonecrótica, a permeabilidade vascular e o acúmulo de fluidos nas alças do íleo de coelhos são sintomas associados com enterotoxinas detectadas em culturas filtradas de linhagens toxigênicas de *B. cereus* (AGATA et al., 1995; BEECHER;

SCHOENI; WONG, 1995; KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000; LUND e GRANUM, 1996). A complexa enterotoxina chamada HBL (BEECHER; SCHOENI; WONG, 1995; BEECHER e WONG, 1997; HEINRICHS et al., 1993; RYAN; MACMILLAN; ZILINSKAS, 1997) é composta de um componente de ligação, B, e dois componentes de líticos, L1 e L2, e requer os três componentes para uma atividade máxima. Outra enterotoxina complexa, formada de três componentes, é denominada NHE, a qual é não hemolítica e tem similaridades com a complexa enterotoxina HBL (LUND e GRANUM, 1996). Também tem sido relatado que a existência de proteínas responsáveis pelo efeito enterotóxico de linhagens de *B. cereus* (ver KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000 para uma revisão).

A toxina emética causa, em humanos, a síndrome da intoxicação alimentar, provocando o vômito. A toxina emética produzida por *B. cereus* consiste de uma estrutura em anel de três repetições de quatro amino- e, ou, oxiácidos com uma massa molecular de 1.2 kDa (AGATA et al., 1994). Esta toxina é resistente ao calor, pH e proteólise, porém não é antigênica (KRAMER e GILBERT, 1989), sendo também é responsável pela inibição da oxidação de ácidos graxos pelas mitocôndrias hepáticas e causar falência do fígado (MAHLER et al., 1997).

Outros fatores de virulência são produzidos por linhagens de *B. cereus* e incluem três tipos de fosfolipases C, cada uma com um mecanismo de ação diferente, o que se supõe contribuir para lesar o tecido por induzir a degradação dos neutrófilos (DING et al., 1995; WAZNY; MUMMAW; STYRT, 1990). As hemolisinas são responsáveis pela atividade hemolítica e tem um papel nas infecções (TURNBULL et al., 1979; TURNBULL e KRAMER, 1983). A cereolisina ou hemolisina I é uma hemolisina termo-lábel, ativada por enxofre e inibida pelo colesterol (COWELL; GRUSHOFF-KOSYK; BERNHEIMER, 1976). Outras hemolisinas compreendem a hemolisina II, a qual não é inibida pelo colesterol

(COOLBAUGH e WILLIAMS, 1978), a hemolisina III (BAIDA e KUZMIN, 1995), a cereolisina AB (GILMORE et al., 1989) e a esfingomielinase, uma proteína hemolítica de 34 kDa que liga a esfingomielina aos eritrócitos (GRANUM e NISSEN, 1993; TOMITA; TAGUCHI; IKEZAWA, 1983).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a produção de toxinas em linhagens de *B. cereus* e identificar a presença de genes responsáveis por sua formação (GUTTMANN e ELLAR, 2000; HANSEN e HENDRIKSEN, 2001; HISIEH et al., 1999; MÄNTYNEN e LINDSTRÖM, 1998; PRÜß et al., 1999). Estes estudos são necessários, dado que nem todas as linhagens desta bactéria têm os genes que codificam para as toxinas, e mesmo nas linhagens que possuem aqueles genes, sua expressão não está sempre presente, sendo modulada por uma variedade de fatores tais como a composição do meio de cultura (ROWAN et al., 2001).

Embora as toxinas mais frequentemente analisadas sejam HBL e NHE, outros fatores de virulência também são bem estudados, incluindo fosfolipases [fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) e fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC)] e esfingomielinases, as quais têm um papel pouco compreendido na intoxicação alimentar. Outros estudos têm buscado detectar a relação entre a produção dessas toxinas e algumas outras características específicas, tais como um marcador de DNA polimórfico amplificado ao acaso por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (GHELARDI et al., 2002) ou a origem das linhagens, por exemplo, amostras de solo, produtos lácteos ou pacientes hospitalizados. Infelizmente, nenhuma evidência foi registrada para tal relação.

Os genes que codificam para as enterotoxinas não são exclusivos das espécies do grupo do *B. cereus*. ROWAN et al. (2001) detectaram a presença de seqüências de DNA associadas com genes que codificam para as enterotoxinas BceT e HBL em várias espécies do gênero *Bacillus*, incluindo linhagens de *B. megabacterium*, *B. subtilis*, *B.*

circulans e *B. licheniformis* isoladas de amostras clínicas e de alimentos. Esses autores também descobriram que algumas das linhagens analisadas foram capazes de aderir, invadir e produzir efeitos citotóxicos às células epiteliais humanas e que a expressão desses genes também é dependente da composição do meio de cultura.

Os esporos de *B. cereus* são ubíquos, o que torna praticamente impossível impedir a presença deles, pelo menos em baixos níveis em alimentos, um fato que realmente foi demonstrado em muitos estudos apontando a detecção de níveis de contaminação microbiana em alimentos. Portanto, a presença de *B. cereus* em um dado item alimentar não pode ser considerado justificativa suficiente para acusar o alimento ou a bactéria como causas de uma deflagração. Por essa razão, é necessário quantificar a abundância de *B. cereus* nos alimentos, assim como conduzir testes bacteriológicos e sorológicos para averiguar a origem da linhagem responsável. As prováveis causas de casos de vômito e diarreia podem somente ser atribuídas a um dado agente após a identificação da presença da mesma linhagem em níveis maiores que 10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de alimento (KRAMER et al., 1982).

Tendo em mente o fato de que cada evento de contaminação alimentar pode ser causado por uma linhagem diferente de *B. cereus*, o que gera variações no tipo de toxinas produzidas e na quantidade de células vegetativas e esporos presentes no alimento, atualmente existe um consenso com respeito à dose necessária para um item alimentar ser considerado seguro ao consumo humano. Essa dose não deve ultrapassar 10^3 UFCs de *B. cereus* em um grama ou mililitro de alimento (GRANUM, 2002).

De acordo com Heyndrickx e Schedelman (2002), a contaminação alimentar por *B. cereus* é fácil de ocorrer porque seus esporos estão presentes em qualquer lugar, o que torna praticamente impossível não ser detectado em alimentos crus e em ingredientes. Por esta mesma razão, contaminações podem ocorrer após tratamentos de calor ineficazes ou devido a

problemas nos materiais utilizados para embalagem. Tratamentos de calor, como a pasteurização (um mínimo de 71,7°C durante 15 segundos), são eficientes para matar células vegetativas, mas não esporos. Desta forma, a ausência de células vegetativas de outros microrganismos no alimento permite que os esporos que sobreviveram ao tratamento com calor se multipliquem com pouca ou nenhuma competição com outros microrganismos. Além do mais, esporos de diversas espécies apresentam características adesivas, o que facilita sua fixação às superfícies internas de encanamentos e equipamentos de processamento alimentar, permitindo a posterior formação de biofilmes.

Considerável ênfase tem sido dada à capacidade de linhagens de *B. cereus* causarem contaminação de alimentos, por isso, a maior parte das publicações envolvendo esta bactéria está relacionada a métodos de detecção rápida dessa espécie em alimentos, assim como a identificação de genes que codifiquem para toxinas. No entanto, esta bactéria tem também importância como espécie modelo do grupo do *B. cereus*, sendo utilizada para estudos de expressão gênica (VAN SCHAIK et al., 2004), de organização estrutural e metabolismo (SEREVIN; TABELI; TOMASZ, 2004) e até mesmo como base de medicamentos probióticos (DUC et al., 2004; HANSEN e SALAMITOU, 2000; JADAMUS et al., 2002). A utilização desta bactéria como modelo tem grande importância na resolução de questões taxonômicas que envolvem além do *B. cereus*, outras espécies de grande importância, como o *B. thuringiensis*.

1.2. *B. thuringiensis*: CARACTERÍSTICAS E EMPREGO BIOTECNOLÓGICO

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia, anaeróbia facultativa, mesófila e quimioheterotrófica. Suas células possuem forma de bastonete com 1,1 µm x 4,0 µm de tamanho, movimentando-se por meio de flagelos peritríquios. Durante a esporulação ou na fase estacionária do seu ciclo de vida, as células de *B. thuringiensis* produzem um cristal parasporal, que é a única característica estabelecida que diferencia *B. thuringiensis* de *B. cereus*.

A atividade entomopatogênica de *B. thuringiensis* é devido à produção desses cristais, os quais são formados por polipeptídios conhecidos como proteínas Cry. Estas proteínas apresentam propriedades entomopatogênicas aos insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Mallophaga, além de nematóides (Strongylida, Tylenchida), protozoários (Diplomonadida) e ácaros (Acari) (FEITELSON; PAYNE; KIM, 1992; SCHNEPF et al., 1998; WHO, 1999).

Os genes *cry*, que codificam para as proteínas Cry, são geralmente encontrados em grandes plasmídios conjugativos ou mais raramente no cromossomo. A síntese da proteína Cry e a formação do esporo são concomitantes na maioria das linhagens, mas a regulação da expressão dos genes *cry* pode ser dependente ou independente da esporulação (AGAISSE e LERECLUS, 1995). Diferentes combinações de genes *cry* são encontradas em várias linhagens de *B. thuringiensis*, incluindo linhagens com um, dois ou até mesmo quatro genes diferentes (LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993). A dispersão destes genes entre linhagens pode ser devido à presença de elementos transponíveis associados aos genes *cry* e a ocorrência do processo de conjugação. Desta forma, é possível explicar porque a mesma toxina pode ser encontrada em isolados de *B. thuringiensis* com

sorotipos diferentes. Assim, diversos trabalhos têm demonstrado que a transferência destes genes por conjugação ocorre em alta frequência nos insetos (ALY; MULLA; FEDERICI, 1985; JARRET e STEPHENSON, 1990; THOMAS et al., 2000, 2001; VILAS-BÔAS et al., 1998), em menor frequência em amostras de solo esterilizado (THOMAS et al., 2000, 2001; VILAS-BÔAS et al., 2000), e parece não ocorrer em solo não esterilizado (FERREIRA et al., 2003).

As seqüências dos genes *cry* forneceram a base para a construção de sondas de genes específicos para que através de metodologias baseadas em hibridação e PCR, pudesse ser pesquisada a presença de seqüências de nucleotídeos conhecidas em linhagens já depositadas em bancos de linhagens e caracterizadas proteínas Cry derivadas de novos isolados de *B. thuringiensis* (BRAVO et al., 1998; JUAREZ-PEREZ; FERRANDIS; FRUTOS, 1997; PREFONTAINE et al., 1987). Essa forma rápida de identificação de genes *cry* tem causado um aumento no número de genes conhecidos. Até hoje, mais de 300 seqüências de genes foram determinadas e classificadas em 47 grupos e diferentes subgrupos com respeito à similaridade dos seus aminoácidos (http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html - acessado em 12/04/2005).

As proteínas Cry podem variar entre 40 kDa a 140 kDa e apresentar uma estrutura tri-dimensional com domínios. O domínio I é formado por um conjunto de sete α -hélices e responsável pela formação de poros no epitélio do tubo digestivo do inseto alvo. O domínio II é formado por três estruturas β -pregueadas intercaladas com alças e tem por função conferir a especificidade de ligação aos receptores celulares. O domínio III apresenta um conjunto de três estruturas pregueadas do tipo β -antiparalelas, sendo responsável pela manutenção dos dois outros domínios (GROCHULSKI et al., 1995; LI; CARROLL; ELLAR, 1991; LI; KONI; ELLAR, 1996).

O mecanismo de ação das proteínas Cry envolve, primeiramente, a solubilização do cristal no tubo digestivo do inseto, dependente de pH ideal (pH 10), através da quebra das pontes de sulfeto entre os monômeros de proteínas Cry, com posterior quebra proteolítica da protoxina pela ação de proteases do inseto, para a liberação da toxina Cry na forma ativa. A toxina ativa liga-se a receptores específicos da porção apical das microvilosidades do tubo digestivo do inseto susceptível. O próximo passo envolve a inserção da toxina na porção apical da membrana e a criação de canais iônicos ou poros que resultarão no extravasamento dos conteúdos celulares, seguida pela morte do inseto (SCHNEPF et al., 1998).

Além das proteínas Cry, algumas linhagens de *B. thuringiensis* podem produzir outras moléculas inseticidas. A beta-exotoxina está associada com certas subespécies de *B. thuringiensis* (*darmstadiensis*, *galleriae*, *tenebrionis* e *thuringiensis*) (SEBESTA e HORSKA, 1970). Esse análogo de nucleotídeo termo-estável, que é composto por adenina, glicose e ácido alárico, inibe as enzimas RNA polimerases pela ação competitiva com o ATP (JOHNSON, 1976). Dado que a síntese de RNA é um processo vital a todos os seres vivos, a beta-exotoxina exerce sua toxicidade em quase todas as formas de vida testadas. Produtos à base de *B. thuringiensis* contendo beta-exotoxina são usados para o controle de moscas (*Musca domestica*) em alguns países, no entanto, as agências regulatórias proíbem o uso da beta-exotoxina para outros propósitos por sua inespecificidade, podendo atuar sobre todos os organismos que utilizam o ATP como fonte de energia, por exemplo, os seres humanos (WHO, 1999).

Uma nova proteína inseticida (Vip), produzida na fase vegetativa da célula, foi identificada em algumas linhagens de *B. thuringiensis* em meio de cultura (ESTRUCH et al., 1996). Como uma família, as proteínas Vip não apresentam qualquer similaridade as proteínas Cry. Os primeiros genes *vip* descritos foram *vip3Aa1* e *vip3Aa2*. As proteínas Vip

possuem toxicidade com a mesma magnitude que as proteínas Cry tem contra insetos susceptíveis. O espectro inseticida das proteínas Vip inclui especificidade a alguns insetos praga das ordens Coleoptera (Vip1 e Vip2) e Lepidoptera (Vip3), os quais têm apresentado insensibilidade às proteínas Cry de *B. thuringiensis* (CHEN et al., 2003; ESTRUCH et al., 1996; SHI et al., 2004).

Estudos sobre toxicidade submetidos à Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos que suportam o registro de produtos à base de subespécies de *B. thuringiensis* são revisados por McClintock, Schaffer e Sjoblad (1995). Os testes incluem os efeitos em mamíferos com exposição via oral, respiratória, dérmica, ocular e intraperitoneal, e testes com animais imuno-competentes e imuno-suprimidos. Também são pesquisados os efeitos em pássaros, vertebrados aquáticos, invertebrados, incluindo os não-insetos e insetos não-alvo, insetos aquáticos, insetos terrestres, abelhas e parasitóides (WHO, 1999). Produtos à base de linhagens de *B. thuringiensis* somente são liberados para a comercialização quando esses testes de toxicidade são negativos para efeitos adversos em ganho de peso, em observações clínicas ou em necrópsia. Os resultados atuais indicam também que os protocolos usados para avaliações da toxicidade/patogenicidade de microrganismos e em animais de laboratórios têm fornecido informações úteis e necessárias para a avaliação dos riscos (MCCLINTOCK; SCHAFFER; SJOBLAD, 1995).

Por causa do modo de ação extremamente específico e da notável segurança, o uso de produtos à base de *B. thuringiensis* na agricultura e nas florestas data de quase 30 anos, quando se tornou disponível na França o primeiro produto comercial. Os produtos convencionais, que utilizam linhagens naturais de *B. thuringiensis*, somam aproximadamente 90% do mercado mundial de agentes microbianos para o controle de insetos (MPCA – *microbial pest control agents*). Esses produtos têm sido utilizados contra insetos-praga principalmente das ordens Lepidoptera e Coleoptera em diversas culturas, como

algodão, milho, soja, batata, tomate, grãos estocados e de reflorestamento, esta última utilização é muito importante por causa da grande variedade de insetos encontrados nessas áreas, o que demanda o uso de inseticidas bastante específicos para prevenir impactos em outros insetos, incluindo os benéficos.

Em acréscimo ao amplo emprego em áreas de lavoura, a partir de 1977, com a descoberta do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* iniciaram-se também programas de controle de pernilongos (*Culex* sp.) e borrachudos (*Simullium* sp.) (BECKER e MARGALIT, 1993). Na Alemanha, por exemplo, os produtos à base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* foram usados no controle de pernilongos (espécies *Anopheles* e *Culex*) (BECKER e MARGALIT, 1993), na China, para o controle do vetor da malária (*Anopheles sinensis*) e no Programa de Controle de Oncocercoses no Oeste da África, foram usados mais de cinco milhões de litros de Bti, de 1982 a 1997, para borrachudos (*Simulium damnosum*), que são os vetores da larva da oncocercose (*Onchocerca volvulus*) (WHO, 1999).

As linhagens de *B. thuringiensis* podem ser encontradas na maioria dos nichos ecológicos, tais como solo (BERNHARDT et al., 1997; MARTIN e TRAVERS, 1989; VILAS-BÔAS e LEMOS, 2004), filoplano de diferentes plantas (HANSEN et al., 1998; SMITH e COUCHE, 1991), insetos e seus habitats (CHILCOTT e WIGLEY, 1993; ITOUA-APOLOYO et al., 1995) e grãos estocados (MEADOWS et al., 1992). Portanto, produtos à base de *B. thuringiensis* podem ser aplicados em vários ecossistemas para alcançar o controle de insetos, tais como folhagens, solos, ambientes aquáticos e grãos armazenados. Após a aplicação do *B. thuringiensis* a um ecossistema, o organismo pode persistir como um componente natural da microbiota. A sobrevivência e atividade das linhagens de *B. thuringiensis* no ambiente foram revisadas por Hansen et al. (1996).

Uma alternativa ao uso de produtos baseados em linhagens de *B. thuringiensis* é a possibilidade da expressão heteróloga dos genes *cry* em outros organismos.

Esses organismos modificados têm sido desenvolvidos para aumentar a gama de hospedeiros, prolongar a atividade no campo ou melhorar o acesso das toxinas aos organismos-alvo. Por exemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus sphaericus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas fluorescences* e a cianobactéria *Anabaena* PCC7120. A multiplicação de linhagens recombinantes de *P. fluorescences* foi usada para produzir um bioinseticida nos quais os cristais protéicos permaneciam encapsulados na célula morta. A razão deste método é a observação de que as formas encapsuladas das proteínas Cry apresentam melhor persistência no meio ambiente, pois a cápsula protege as proteínas Cry dos raios ultravioletas que as degradam rapidamente (FEDERICI et al., 2003; KUMAR e UDAYASURIYAN, 2004; MANASHEROB et al., 2003; PENG et al., 2003; SANCHIS, 2000; TANAPONGPIPAT et al., 2003).

Bactérias endofíticas e epifíticas também têm sido usadas como vetores, possibilitando prolongar a persistência dos cristais no campo, pelo fato de poder se propagar no sítio de alimentação dos insetos-alvo e continuar produzindo o cristal protéico. Um exemplo deste sistema é a introdução do gene *cry1Ac* em *Clavibacter xyli*, uma bactéria endofítica, resultando em uma linhagem recombinante, a qual tem sido inoculada em milho para o controle de lagartas (TOMASINO et al., 1995). Da mesma maneira esse sistema tem sido utilizado com outros colonizadores de plantas, como *Azospirillum* spp., *Rhizobium leguminosarum* e *Pseudomonas* spp. (GOUNDER e RAJENDRAN, 2001; OBUKOWICZ et al., 1986; SANCHIS, 2000).

Além da introdução em microrganismos, vários genes *cry* têm sido introduzidos também em plantas, inicialmente em plantas de tabaco e atualmente sendo encontrados em mais espécies cultivadas, dentre as quais podemos citar a alfafa, o algodão, o arroz, a maçã, o milho, a pêra, o brócolis, a soja e a cana-de-açúcar (ARANTES; VILAS-BÔAS, L.; VILAS-BÔAS, G., 2002; GOULD, 1998; SHELTON; ZHAO; ROUSH, 2002).

A produção de proteínas Cry em plantas pode oferecer vários benefícios e estão revolucionando a agricultura no mundo. Em várias plantas as proteínas Cry são produzidas continuamente e persistem no tecido da planta (SIMS e HOLDEN, 1996), resultando em menor número de aplicações de outros inseticidas, reduzindo os custos do manejo em campo. Em algumas plantas as proteínas Cry podem ser expressas somente onde e quando necessárias através do uso de tecido específico, tempo específico ou genes promotores induzíveis (SHELTON; ZHAO; ROUSH, 2002). Portanto, as tão chamadas plantas Bt são vantajosas por produzirem menos danos ao ambiente que os inseticidas químicos. As principais desvantagens das plantas Bt são: o potencial desenvolvimento de resistência do inseto às proteínas Cry e o fluxo gênico para variedades selvagens. No entanto, várias estratégias são propostas para retardar o desenvolvimento da resistência e impedir o fluxo gênico para outras variedades (BOURGUET, 2004; GOULD, 1998; WISNIEWSKI et al., 2002).

Em suma, o amplo conhecimento do modo de ação das proteínas Cry produzidas por *B. thuringiensis* e sua alta especificidade, como também as novas tecnologias são alguns dos fatores que permitiram o desenvolvimento do vasto campo de utilização dos bioinseticidas à base desta bactéria, há mais de 30 anos. No entanto, a indefinição quanto à questão taxonômica que envolve esta bactéria dentro do grupo do *B. cereus* é um problema atual, que deve ser investigado a fim de que se possa corroborar a segurança da utilização dos produtos à base de *B. thuringiensis*.

1.3. TAXONOMIA DO GRUPO DO *B. cereus*

O termo “Grupo do *Bacillus cereus*” não é um termo taxonômico, mas tem sido comumente utilizado e refere-se a um grupo de bactérias cuja posição taxonômica tem sido amplamente discutida. Este grupo é classicamente composto por quatro espécies, *B. cereus*, considerada a espécie modelo do grupo, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. mycoides*. Mais recentemente foram incluídas duas outras espécies, *B. pseudomycooides* (NAKAMURA, 1998) e *B. weihenstephanensis* (LECHNER et al., 1998).

Estudos genômicos extensivos realizados com linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* empregando diferentes ferramentas como eletroforese de isoenzimas (MLEE) (HELGASON et al., 1998), sequenciamento de genes codificantes de proteínas (HELGASON et al., 2000b), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) (HILL et al., 2004; TICKNOR et al., 2001) e a técnica de tipagem de seqüências multilocus (MLST) (HELGASON et al., 2004), têm sugerido a classificação de *B. thuringiensis* e *B. anthracis* como subespécies da espécie *B. cereus*. Estes estudos estão fundamentados no fato de que a distinção entre estas espécies é dada por características fenotípicas cujos genes estão localizados em plasmídios, assim é a produção do cristal protéico pelas células de *B. thuringiensis* e a produção de toxinas e de cápsula pelas células de *B. anthracis*.

As seqüências dos nucleotídeos do DNAr 16S e do DNAr 23S dessas três espécies apresentam um nível muito alto de similaridade (ASH et al., 1991b; ASH e COLLINS, 1992; MANZANO et al., 2003), indicando que elas divergiram recentemente de uma mesma linha evolutiva (GRANUM, 2002). Portanto, a análise das seqüências desses genes pode ser utilizada apenas para caracterizar uma dada linhagem como pertencente ao

grupo do *B. cereus*, sem ser capaz de identificar a espécie. Assim, novos e apropriados marcadores moleculares taxonômicos, baseados em outros genes, são necessários. Yamamoto e Harayama (1995) sugeriram que genes não dispersos horizontalmente entre diferentes espécies bacterianas podem ser usados para traçar o registro evolutivo de bactérias. Com base nas informações de que a taxa média de substituição de nucleotídeos para o gene do DNAr 16S é de 1% por 50 milhões de anos e de que essa mesma taxa é de 0,7% a 0,8% por um milhão de anos para seqüências de DNA que codificam para proteína, esses autores sugeriram o gene *gyrB* como um marcador molecular taxonômico para espécies bacterianas, substituindo gene do DNAr 16S. O gene *gyrB* é essencial à replicação do DNA, codificando para a subunidade- β (um domínio ATPase) de uma DNA girase (topoisomerase tipo II), que regula o super enovelamento da molécula de DNA. Este é um gene de cópia única, que contém regiões conservadas e, portanto, podem ser usadas para o desenvolvimento de iniciadores de PCR.

Usando o gene *gyrB*, Yamada et al. (1999) amplificaram, sequenciaram e desenvolveram um conjunto de iniciadores para identificar linhagens de *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* sem analisar seus fenótipos, sorotipos e fatores de virulência. Manzano et al. (2003) detectaram a presença de linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* em amostras de diferentes origens. Posteriormente, esse gene foi usado em conjunto com a técnica de hibridação DNA:DNA para obter a discriminação das quatro espécies que tradicionalmente compõem o grupo do *B. cereus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. mycoides*) (LA DUC et al., 2004). No entanto, essas análises não discriminaram bem linhagens de *B. anthracis* e *B. thuringiensis* não virulentas daquelas de *B. cereus*, devido ao alto nível de transferência genética lateral dentro desse grupo de bactérias (READ et al., 2003; VILAS-BÔAS et al., 2002).

Além do gene *gyrB*, outros genes essenciais também vêm sendo recentemente utilizados no estudo das relações filogenéticas neste grupo de bactérias. Chang et al. (2003) obtiveram árvores filogenéticas a partir das seqüências de nucleotídios do gene *groEL*, que codifica para uma proteína altamente conservada que está envolvida com a organização da conformação de outras proteínas (chaperonina) e o gene *sodA*, que codifica para uma enzima dependente de manganês (superóxido desmutase dependente de manganês). Estes genes foram utilizados para identificação de espécies e classificação taxonômica do gênero *Staphylococcus* (GOH et al., 1997) e de várias espécies de *Streptococcus* (POYART et al., 1998) e *Enterococcus* (POYART; QUESNE; TRIEU-CUOT, 2000).

A árvore filogenética obtida a partir das seqüências do gene *sodA* apresentou substancial similaridade com a árvore filogenética obtida a partir das seqüências do gene *groEL*, localizando espécies diferentes em agrupamentos diferentes, com as linhagens de *B. anthracis* sendo mais intimamente relacionadas as linhagens de *B. cereus*, tendo sido também obtidas sondas de oligonucleotídeos para a identificação de linhagens de *B. anthracis*, uma espécie bastante homogênea e com uma aparente maior relação com *B. cereus* e *B. thuringiensis* do que com as demais espécies do grupo.

Embora ainda não exista um consenso na literatura, alguns artigos já demonstraram a discriminação de linhagens de *B. anthracis* em relação a *B. cereus* e *B. thuringiensis* (CHANG et al., 2003; HARREL et al., 1995; KEIM et al., 1997; RADNEDGE et al., 2003). Esses resultados são devido a baixa variabilidade genética que é característica dessas espécies, em contraste a alta variabilidade genética de *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Essa baixa variabilidade genética é provavelmente um resultado do seu ciclo de vida dentro do hospedeiro, onde a fase de crescimento vegetativo tem uma natureza explosiva. Devido a essa rapidez, o número de recombinações genéticas diminua ou até mesmo cessa entre as linhagens de *B. anthracis* ou com outras espécies (SCHUPP et al., 2000).

O polimorfismo genético apresentado pelas linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* e a extensiva similaridade de seus conjuntos gênicos são os principais fatores que complicam a resolução da questão taxonômica entre essas duas espécies. Um dos primeiros estudos apontados à investigação das suas relações taxonômicas foi conduzido por Carlson et al. (1994) usando gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e MLEE. Um alto grau de variabilidade genética foi observado dentro e entre as duas espécies, não sendo possível agrupar separadamente cada espécie, tendo sido sugerido o agrupamento de *B. cereus* e *B. thuringiensis* como uma única espécie.

Outros estudos, usando o MLEE e a análise de seqüências de genes cromossômicos, apresentaram alto grau de similaridade genética e indicaram a falta de diferenciação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* (HELGASON et al., 1998; HELGASON et al., 2000a; HELGASON et al., 2000b). Ticknor et al. (2001), baseado em resultados de AFLP, MLEE altamente polimórficos e dados de seqüências de DNAr 16S mostraram que uma simples análise de um número limitado de linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* não é suficiente para caracterizar essas espécies.

Em 2002, um estudo realizado por Vilas-Bôas et al. usando MLEE e analisando a atividade hemolítica de populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, isto é, populações obtidas de um mesmo local ao mesmo tempo, encontrou que as populações de uma dada espécie de *Bacillus* – *B. thuringiensis* ou *B. cereus* – de diferentes amostras de solo foram mais similares geneticamente umas com as outras do que com as populações da outra espécie de *Bacillus* da mesma amostra de solo. Os resultados sugeriram também que a taxa de fluxo gênico foi maior entre as linhagens da mesma espécie, mas que as trocas genéticas interespecíficas, isto é, entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* foram, apesar disso, possíveis.

A diferenciação genética entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* também foi obtida por Cherif et al. (2003) através da caracterização de um padrão de rep-PCR usando o iniciador BOX-A1R, utilizando uma coleção de linhagens das seis espécies do grupo do *B. cereus*. Agrupamentos de linhagens de *B. cereus* foram muito distintos daqueles de *B. thuringiensis*. Além disso, as relações entre as outras espécies do grupo foram inferidas, indicando uma clara separação entre as espécies, sugerindo a manutenção de todas as espécies do grupo (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*) como unidades taxonômicas distintas.

Helgason et al. (2004) utilizaram MLST para analisar 77 linhagens do grupo do *B. cereus*, das quais 67 já tinham sido analisadas anteriormente por MLEE, tendo sido desenhados iniciadores para as regiões conservadas de sete genes estruturais. Análises das seqüências de dados demonstraram que os resultados do MLST estão de acordo com os resultados obtidos anteriormente por MLEE, *i.e.* que *B. cereus*, *B. anthracis*, e *B. thuringiensis* devem ser consideradas como uma espécie.

Outros resultados baseados no método MLST incluem Bavykin et al., 2004; Ko et al., 2004; Priest et al., 2004. Estudos baseados em análises de seqüências de DNA têm várias vantagens, incluindo precisão e reprodutibilidade (MAIDEN et al., 1998; SPRATT, 1999). Além disso, os dados obtidos podem ser analisados sob uma variedade de aspectos filogenéticos e de genética de populações, o que possibilitar estabelecer a natureza da variabilidade genética e investigar possíveis modelos evolutivos que justifiquem o surgimento da mesma (PRIEST et al., 2004).

Em 2002, o sequenciamento do genoma da linhagem de *B. anthracis* A2012 foi publicado (READ et al., 2002). Desde então, as seqüências completas do genoma de várias linhagens do grupo do *B. cereus* tornaram-se disponíveis em bancos de dados, incluindo três linhagens de *B. anthracis* (A2012, Ames, Sterne), três de *B. cereus* (ATCC 14579, ATCC

10987, ZK) e uma de *B. thuringiensis* (linhagem 97-27 sorovar *konkukian*). Em acréscimo aos genomas já disponíveis, oito outros projetos de seqüenciamento de genomas estão atualmente em andamento: *B. anthracis* linhagens A1005, Austrália 94, CNEVA-9066, Kruger B, Vollum e Western North América USA 6153, além da linhagem G9241 de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Uma boa revisão dos projetos de seqüenciamento de genomas deste grupo de bactérias é encontrada em Rasko et al. (2005).

O seqüenciamento de genoma e as tecnologias de estudo funcional de genomas, tais como análise por microarranjos de DNA e perfil proteômico, permitem o estudo de espécies bacterianas a níveis de detalhamento nunca alcançados anteriormente. Ivanova et al. (2003), por exemplo, fizeram análises comparativas entre os genomas de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. anthracis* A2012 e encontraram que a linhagem de *B. cereus* apresentou 5,366 seqüências codificadoras (CDSs), das quais 4,505 têm 80-100% de identidade às suas homólogas em *B. anthracis*. Os genes potencialmente ortólogos representam 75% das CDSs para cada um dos genomas e 85% desses genes potencialmente ortólogos têm regiões adjacentes conservadas. Esses autores discutem que a grande conservação entre os conjuntos gênicos dessas bactérias é resultado da herança a partir de um ancestral comum.

As publicações das seqüências dos genomas completos de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. anthracis* Ames (IVANOVA et al., 2003; READ et al., 2003) também enfatizaram a importância do regulador pleiotrópico PlcR, descrito por Lereclus et al. (1996) e melhor detalhado por Agaisse et al. (1999). O gene *plcR* é considerado como um dos principais reguladores dos genes de virulência de *B. cereus*, tendo sido identificada uma seqüência de ligação específica à proteína PlcR localizada imediatamente antes ao início do sítio de transcrição de mais de 100 genes no genoma destas bactérias.

Entre os genes regulados pelo PlcR e que estão potencialmente envolvidos na virulência, encontram-se fosfolipases [fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-

PLC), fofolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC)], esfingomielinases, hemolisinas dependentes de colesterol (cereolisina Clo em *B. cereus* e thuringiolisina Tlo em *B. thuringiensis*), proteases (ColB, InhA, Sfp, NprB, NprP2), uma citotoxina (CytK) e duas enterotoxinas, uma hemolítica (HBL) e outra não hemolítica (Nhe) (AGAISSE et al., 1999; BRILLARD e LERECLUS, 2004; GOHAR et al., 2002).

Embora muitos desses genes também sejam encontrados em *B. anthracis*, esta bactéria não os expressa. As linhagens de *B. anthracis* são não móveis, são sensíveis a antibióticos β -lactâmicos e não hemolíticas em placas de ágar-sangue, enquanto que a maioria das linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* são móveis, resistentes a esse grupo de antibióticos e hemolíticas. Essas características são reguladas pelo PlcR e são comumente usadas para distinguir *B. anthracis* de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Tabela 2). Por isso, algumas das maiores diferenças usadas para diferenciar *B. anthracis* dessas duas outras espécies não resultam da presença ou ausência de genes, mas principalmente da ocorrência de mudanças na expressão do gene *plcR* nas linhagens de *B. anthracis* (MIGNOT et al., 2001).

Em um estudo realizado em 2004, Slamti e colaboradores, trabalhando com linhagens de *B. anthracis* e linhagens não hemolíticas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, verificaram que todas as linhagens de *B. anthracis* possuíam a mesma mutação sem sentido no gene *plcR*, que codifica para uma proteína PlcR inativa. Ao contrário, entre as linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* testadas e que apresentam os fenótipos característicos das linhagens de *B. anthracis*, diferentes mutações foram detectadas no mesmo gene, sem correspondência com a mutação conservada em *B. anthracis*. Baseando-se nesses resultados foi possível sugerir que esta mutação típica das linhagens de *B. anthracis* pode ser usada como uma característica para identificar esta espécie.

Ko et al. (2004), investigaram a estrutura populacional do grupo do *B. cereus* através do seqüenciamento de sete fragmentos de genes cromossômicos, incluindo o

gene *plcR*, o qual apresentou características que diferiram daquelas dos outros demais seis genes em termos de conservação de seqüências. Os autores sugeriram que a história evolutiva do gene *PlcR* difere daquela dos outros genes cromossômicos e que processos de recombinação envolvendo o gene *plcR* podem ter sido freqüentes.

Tabela 2. Algumas características básicas para a identificação das espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*.

	Espécies		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Crescimento anaeróbico	+	+	+
Produção de catalase	+	+	+
Utilização de citrato	+	V	+
Hidrólise de caseína	+	+	+
Redução de nitrato	+	+	+
Reação Voges-Proskauer (V-P)	+	+	+
pH em meio V-P < 6,0	+	+	+
Crescimento em NaCl 7%	+	+	+
Crescimento a 60°C	-	-	-
Ácido de AS glicose	+	+	+
Ácido + Gás de AS glicose	-	-	-
Lise por fago gama	-	+	-
Motilidade	+ ^a	-	+ ^a
Hemólise em ágar com sangue de carneiro	+ ^a	-	+ ^a
Resistência a antibióticos β-lactâmicos	+ ^a	-	+ ^a
Cápsula de polipeptídeo glutamyl	-	+	-
Inclusões parasporais	-	-	+

Fonte: adaptada de Turnbull, 1996.

^a mais de 95% das linhagens; V, variável; -, negativo; +, positivo.

Ivanova et al. (2003) e Read et al. (2003) analisaram o potencial metabólico apresentado pelo conjunto gênico das linhagens de *B. cereus* e *B. anthracis* que tiveram seus genomas seqüenciados, encontrando evidências contra a hipótese de ser uma bactéria de solo o ancestral comum dessas espécies. De acordo com esses autores, as bactérias de solo são caracterizadas pela presença de múltiplas vias catabólicas de carboidratos em seus genomas, o que permite a utilização de material derivado de plantas como sua principal fonte de

nutrientes. Por exemplo, *B. subtilis* tem 41 genes para a degradação de polímeros de carboidratos (KUNST et al., 1997). Por outro lado, em *B. cereus* e *B. anthracis* foram identificados apenas 14 e 15 CDSs codificantes para enzimas envolvidas em vias de degradação de polissacarídeos, respectivamente. Além disso, as funções desses genes estão limitadas à degradação de glicogênio, amido, quitina e quitosana, importantes componentes de tecidos de invertebrados. Em *B. cereus* foram identificados, ao todo, 51 genes codificantes para proteases e em *B. anthracis* 48 genes, além de terem sido identificados também muitos genes codificantes para transportadores de peptídeos e aminoácidos. Essas observações indicam que a fonte natural de alimentos de ambas as espécies é tecido animal degradado e que o provável habitat para o ancestral comum do grupo do *B. cereus* pode ter sido o intestino de insetos.

A seqüência completa do genoma do *B. cereus* ATCC 10987 (RASKO et al., 2004) revela que esta linhagem é mais similar geneticamente a *B. anthracis* Ames do que a *B. cereus* ATCC 14579, que também já foi seqüenciada. Embora essa observação não seja uma surpresa, ela confirma o grupo do *B. cereus* como uma complexa mistura de genótipos parcialmente característicos, que apresentam o compartilhamento de algumas identidades comuns como consequência da transferência gênica horizontal entre membros deste grupo.

A disponibilidade de seqüências do genoma inteiro de várias linhagens do grupo do *B. cereus*, combinada com estudos de genômica funcional incluindo ferramentas como microarranjos de DNA e proteômica irão fornecer o entendimento da dinâmica da evolução do genoma nessas espécies e conseqüentemente, obter avanços substanciais na classificação neste grupo de bactérias.

1.4. O USO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA REPETITIVO EM ANÁLISES GENÉTICAS

Os elementos de seqüências repetitivas de DNA têm sido amplamente estudados em organismos procaríotos e eucariotos. Nestes últimos organismos, os elementos de seqüências repetitivas e intercaladas de DNA mais conhecidos são os da família *Alu*, identificados em espécies de mamíferos (HOUCK; RINEHART; SCHMID, 1979; JELINEK et al., 1980; SCHMID e JELINEK, 1982). A natureza conservada e a distribuição intercalada das repetições *Alu* têm sido exploradas para se amplificar seqüências únicas de DNA entre as repetições *Alu* (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985) e estas seqüências repetitivas de DNA espécie-específica tem sido bastante usadas para diferenciar espécies intimamente relacionadas (RIKKE; GARVIN; HARDIES, 1991), embora a função dessas seqüências ainda permaneça desconhecida.

Os genomas dos organismos procaríotes são muitos menores que aqueles de espécies eucaríotes com aproximadamente 10^6 versus 10^9 pares de base de DNA, respectivamente. Os genomas dos organismos procaríotos podem ter sido reduzidos por pressões seletivas voltadas a rápida reprodução celular e à conseqüente rápida replicação de DNA (DOOLITTLE, 1978). Assim, seqüências de DNA repetitivo não codificantes também deveriam ser reduzidas, pela ação da seleção natural, a uma quantidade mínima, priorizando o rápido crescimento, a menos que estas seqüências apresentem importantes funções.

Existem várias famílias de seqüências repetitivas de DNA que têm sido estudadas em organismos procaríotos, sendo as seqüências repetitivas palindrômicas extragênicas (REP – *Repetitive Extragenic Palindromic*) e as seqüências enterobacterianas repetitivas conservadas e intergênicas (ERIC – *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) as mais correntemente estudadas.

As seqüências REP, descobertas em 1982 em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (HIGGINS et al., 1982), são as mais intensivamente estudadas e foram identificadas através de comparações das seqüências de DNA das regiões intercistrônicas de diferentes operons (GILSON et al., 1984; HIGGINS et al., 1982). Elas são formadas por uma seqüência conservada de 38 nucleotídeos, constituindo um palíndromo, e podem formar uma estrutura em grampo estável. Estas seqüências também contém seis posições totalmente degeneradas incluindo 5 pares de bases na região central do grampo (STERN et al., 1984; YANG e AMES, 1990).

Com relação à funcionalidade das seqüências REP sugere-se que estas estejam ligadas à regulação da tradução de diversas regiões dentro dos operons, isto devido a sua natureza palindrômica e a habilidade de formar estruturas em grampo estáveis nos RNA transcritos (HIGGINS et al., 1982). Além disso, também tem sido proposto que estas seqüências tenham participação na regulação gênica pela tradução diferencial dentro de operons policistrônicos e pela estabilização do RNAm ativo transcrito, na terminação da transcrição e na organização *in vivo* do cromossomo bacteriano em domínios (GILSON et al., 1986; GILSON et al., 1990; HIGGINS et al., 1982; NEWBURY; SMITH; HIGGINS, 1987; NEWBURY et al., 1987; STERN et al., 1984; STERN; PROSSNITZ; AMES, 1988; YANG; AMES, 1988,1990).

Recentemente foi demonstrado que a presença das seqüências REP em moléculas de RNAm constitui uma barreira à digestão pela exonuclease 3'-5', estabilizando, portanto, a mensagem e conseqüentemente aumentando a expressão gênica (HIGGINS; MCLAREN; NEWBURY, 1988; MERINO et al., 1987; NEWBURY et al., 1987; NEWBURY; SMITH; HIGGINS, 1987; STERN; PROSSNITZ; AMES, 1988). Além disso, alguns autores também relatam uma ligação ao término da transcrição como uma rara exceção (HUDSON e DAVIDSON, 1984), propondo que as seqüências REP, por não estarem sempre

presentes nas mesmas regiões intergênicas em diferentes espécies, não sejam elementos essenciais no mecanismo de expressão gênica, embora quando presentes possam influenciar na quantidade ou na regulação da expressão de um gene ou operon.

Também tem sido relatado a ligação da DNA girase (YANG e AMES, 1988) e da DNA polimerase I (GILSON; PERRIN; HOFNUNG, 1990) às seqüências REP, e que as proteínas HU (*histone-like proteins*) estimulam a ligação da DNA girase à estas seqüências (YANG e AMES, 1990), o que indica o envolvimento das mesmas na compactação do nucleóide bacteriano (GILSON et al., 1987; STERN et al., 1984). Todas as características dos elementos REP são apresentadas também pelas seqüências repetitivas da família *Alu*, em genomas de mamíferos.

Em 1990 e 1991, em vários membros da família *Enterobacteriaceae*, inclusive *E. coli* e *S. typhimurium* (SHARPLES e LLOYD, 1990), foram descritas novas seqüências repetitivas de DNA identificadas como seqüências ERIC. Estas seqüências também foram identificadas em regiões intergênicas dentro e entre operons e parecem ser capazes de adotar uma conformação estrutural secundária em forma de grampo, muito semelhante às seqüências REP. Contudo, as seqüências ERIC apresentam algumas diferenças em relação às seqüências REP, sendo compostas por uma maior quantidade de pares de bases (124-127) e não restritas apenas às regiões transcritas 3' dos genes (SHARPLES e LLOYD, 1990).

As seqüências ERIC são localizadas em regiões transcritas e não codificadoras do cromossomo. Frequentemente são localizadas entre genes em operons com a posição variando em relação ao promotor ou terminador nas diferentes repetições, não estando completamente definido se estas seqüências são ou não transcritas (SHARPLES e LLOYD, 1990). Estas seqüências podem ser encontradas em diferentes posições em diferentes espécies. Em localizações análogas, independentemente da presença ou da ausência da seqüência ERIC

em diferentes espécies, a seqüência vizinha não é alterada, sugerindo ou a deleção ou a inserção precisa desta seqüência (SHARPLES e LLOYD, 1990).

A função das seqüências ERIC ainda não foi completamente esclarecida, mas devido a frequente localização dentro de grandes operons multigênicos, é forte a possibilidade destas seqüências estarem regulando a expressão de genes associados (SHARPLES e LLOYD, 1990).

Além das seqüências repetitivas REP e ERIC, outras seqüências de DNA repetitivo têm sido identificadas em genomas de organismos procariontes utilizando-se de experimentos de hibridação. Normalmente, um grande fragmento de DNA é clonado e utilizado como sonda para o DNA genômico, produzindo um complexo padrão de hibridação, o qual consiste com múltiplas cópias de parte ou de toda a seqüência clonada (LUPSKI e WEINSTOCK, 1992).

A evolução dos genomas bacterianos tem sido relacionada com duplicações, inversões e outros rearranjos (KOMINE et al., 1990; RILEY e KRAWIEC, 1987), sendo estes eventos freqüentemente relacionados com seqüências de DNA repetitivo. Portanto, a organização do genoma depende da ação da seleção natural e, sendo assim, a dispersão de seqüências repetitivas de DNA pode ser um indicativo da estrutura e da evolução do genoma bacteriano (LUPSKI e WEINSTOCK, 1992).

Muitas espécies bacterianas apresentam seqüências repetitivas e intercaladas em seus genomas, como por exemplo, *Agrobacterium* spp., *Bordetella pertussis* e *Rhizobium* spp., (LUPSKI e WEINSTOCK, 1992). Assim, a caracterização de seqüências repetitivas e conservadas nos genomas bacterianos, principalmente das seqüências REP e ERIC, tem sido realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), o que originou a ferramenta chamada rep-PCR (*Repetitive Element Polymorphism*).

Versalovic, Koeuth e Lupski (1991) foram os responsáveis por delinear pares de seqüências iniciadoras correspondentes às seqüências palindrômicas REP e ERIC. Devido à conservação destas seqüências, a orientação dos iniciadores tem sentido oposto ao centro das seqüências, amplificando as regiões localizadas entre duas repetições, o que permite a obtenção de padrões específicos para espécies e linhagens bacterianas. Contudo, o tamanho das seqüências amplificadas está limitado à capacidade de extensão da DNA polimerase (~ 5 kb).

A técnica de rep-PCR tem sido muito utilizada para a análise de bactérias por ser uma técnica rápida, de fácil aplicação e boa reprodutibilidade. Dentro do gênero *Bacillus*, que é composto por uma grande diversidade de espécies, muitos trabalhos já foram realizados com a utilização desta técnica para diversas finalidades (HERMAN e HEYNDRICKX, 2000; MITEVA; SELENSKA-POBELL; MITEV, 1999; SOUTO et al., 2004).

Miteva, Selenska-Pobell e Mitev (1999), realizaram através de duas técnicas, umas delas a de rep-PCR, a análise de relações genéticas entre 15 linhagens de *B. sphaericus*, buscando a diferenciação genética das linhagens estudadas, as quais são pertencentes a cinco grupos homólogos, para confirmação de resultados anteriormente obtidos por outros métodos, os quais tinham evidenciado que os representantes desta espécie são altamente heterogêneos e muito relacionados às linhagens patogênicas de pernilongos do grupo IIA. O método de rep-PCR, nunca antes realizado para *B. sphaericus*, permitiu a diferenciação da maior parte das 15 linhagens, portanto, comprovando seu grande poder discriminatório e demonstrando ser uma ferramenta importante e viável para uma rápida identificação de novos isolados, patogênicos ou não a pernilongos, evitando testes de patogenicidade demorados. Além de permitir a realização de uma caracterização estrutural do genoma mais objetiva e precisa.

Souto et al. (2004) também utilizaram a técnica de rep-PCR na caracterização genética e funcional da linhagem BNM 122 de *Bacillus* sp, uma linhagem com importante aplicação biotecnológica, devido à produção de substâncias antifúngicas. Esta linhagem apresenta similaridade genética ora com *Bacillus amyloliquefaciens*, ora com *Bacillus subtilis* dependendo do método de análise. Os resultados demonstraram que esta técnica apresentou resultado compatível com a análise do espaço intergênico entre o DNAr 16S e 23S, e aponta a classificação desta linhagem como *B. amyloliquefaciens*.

Do mesmo modo, para o grupo do *B. cereus* vários trabalhos tem aplicado a técnica de rep-PCR, como por exemplo, para o estudo das relações genéticas das espécies pertencentes a este grupo (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991), a taxonomia de espécies relacionadas (CHERIF et al., 2002) e a caracterização de linhagens de *B. cereus* e *B. anthracis* (SHANGKUAN et al., 2000).

1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises genômicas têm recentemente mostrado que uma fração dos genomas de espécies de bactérias (frequentemente 5% - 15%) é originada de outras espécies devido à transferência de segmentos homólogos ou heterólogos incluindo elementos transponíveis, plasmídios ou fagos (MAJEWSKI e COHAN, 1999; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000). Essa observação enfatiza a importância das trocas genéticas em bactérias, levando a profundas diferenças entre elas e os eucariotos superiores (animais e plantas), os quais são geralmente a base para o conceito atual de espécie. Ao contrário dos eucariotos, que são sistemas geneticamente fechados, as bactérias são abertas a

transferência gênica até mesmo com espécies filogeneticamente distantes. Além disso, enquanto as plantas e animais devem evoluir exclusivamente a partir de seus próprios materiais genéticos, cada espécie bacteriana, como resultado das trocas de material genético, pode apresentar adaptações provenientes de uma grande diversidade de outras espécies (COHAN, 2002).

Conseqüentemente, deve-se considerar que o processo de especiação em bactérias requer essencialmente divergência ecológica, enquanto em eucariotos superiores é necessária também a divergência reprodutiva (COHAN, 1994). Desta forma, na sistemática de bactérias, uma espécie deve ser considerada mais que um agrupamento de organismos intimamente relacionados que apresentam propriedades dinâmicas similares. O conceito ecológico de espécie, descrito por van Valen (1976), é particularmente útil nesse contexto. Ele sugere que diferentes espécies ocupem diferentes nichos ecológicos, ou por usarem diferentes fontes nutricionais, ou por usarem as mesmas fontes nutricionais em diferentes tempos, ou por ocuparem diferentes microhabitats (nicho é a variedade de fatores em um ambiente que limita o crescimento de um dado organismo em relação a outros).

Assim, de acordo com o princípio da exclusão de nichos (HARDIN, 1960), um nicho pode suportar apenas um tipo de organismo, indiferentemente se este é um genótipo ou uma espécie. Portanto, no caso do grupo do *B. cereus* é necessário investigar se as características genéticas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* são suficientes para permitir a ocupação de diferentes nichos ecológicos no ambiente. Desta forma, em acréscimo aos estudos de diversidade genética, especial atenção deve ser dada também à ecologia, a genética de populações e aos aspectos evolutivos que norteiam a origem e o destino da diversidade genética nessas espécies.

Neste contexto, deve-se lembrar que a estrutura ambiental está intimamente conectada com a origem e manutenção da variabilidade genética. Portanto, o desenho

experimental de futuros estudos ecológicos deve considerar o *fitness* dos genótipos estudados, isto é, a medida da habilidade de um dado genótipo se reproduzir em relação a outros genótipos, sempre levando em conta a interação entre os genótipos trabalhados e entre os genótipos e o ambiente.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Obter populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* por isolamento a partir de amostras de solo de regiões de mata e pastagem;
- Avaliar as relações de similaridade genética e a estrutura populacional das populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.

3. ARTIGO 1: Determinação das relações genéticas entre populações simpátricas de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.

Este artigo será submetido para publicação na revista *Journal of Applied Microbiology*.

1
2 Genetic relationship between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus*
3 *thuringiensis* by REP-PCR genomic fingerprinting

4
5 Determinação das relações genéticas entre populações simpátricas de *Bacillus cereus* e
6 *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.

7
8
9
10
11 A.P.S. Peruca^{1*}, G.T Vilas-Bôas¹ and O.M.N. Arantes¹.

12
13
14
15 ¹Departamento de Biologia Geral, CCB, UEL, CP 6001, Londrina/PR, 86051-990, Brazil

16
17
18
19
20 Abbreviated Title: REP-PCR in the *Bacillus cereus* group

21 Título Abreviado: REP-PCR no grupo do *Bacillus cereus*

22
23
24
25 ^{*}Corresponding author:

26 Mailing address: Departamento de Biologia Geral, CCB, UEL, CP 6001, Londrina/PR,
27 86051-990, Brazil. Phone: (55) 43 3371 4527. Fax: (55) 43 3371 4440. E-mail:

28 oarantes@uel.br.

RESUMO

Objetivos: Avaliar as similaridades genéticas e a estrutura genética de populações simpátricas de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* pelo perfil de REP-PCR.

Métodos e Resultados: Foram isoladas linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo coletadas ao mesmo tempo de duas áreas geográficas separadas, região de mata e região de pastagem. Um total de 56 linhagens de *B. cereus* e de 60 de *B. thuringiensis* foram avaliadas por REP-PCR. Análise das relações genéticas em ambas as áreas trabalhadas apresentou que linhagens de *B. thuringiensis* agruparam-se separadas das linhagens de *B. cereus*. Populações de *B. thuringiensis* apresentaram estrutura populacional clonal, ao contrário de populações de *B. cereus*.

Conclusões: As relações genéticas deduzidas a partir dos perfis de REP-PCR indicam que, a despeito da grande similaridade genética existente entre estas espécies, as mesmas apresentam estruturas populacionais distintas, sugerindo que elas devem permanecer como unidades taxonômicas separadas.

Significância e Impacto deste Estudo: Futuras análises taxonômicas envolvendo estas espécies devem levar em conta a determinação da estrutura genética populacional e o comportamento da bactéria no ambiente.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, relações genéticas, populações simpátricas, estrutura populacional, REP-PCR.

1 INTRODUÇÃO

2
3 No grupo do *Bacillus cereus*, que é composto atualmente por seis espécies (*B. cereus*,
4 *B. thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus pseudomycooides* e *Bacillus*
5 *weihenstephanensis*), três espécies merecem destaque devido a sua importância patogênica e
6 econômica. *B. cereus*, um conhecido contaminante de alimentos que, ocasionalmente, é
7 associado a casos de infecções locais e sistêmicas em humanos (Kotiranta et al. 2000).
8 *Bacillus anthracis*, um patógeno de mamíferos, agente etiológico da doença Antrax
9 (Drobniowski 1993) e *Bacillus thuringiensis*, um organismo amplamente utilizado para o
10 controle biológico de insetos em todo o mundo (Schnepf et al. 1998).

11 Dada a importância das duas primeiras espécies na área de saúde e a ampla utilização
12 de produtos à base de *B. thuringiensis* no controle biológico, é necessária uma clara avaliação
13 das relações taxonômicas e filogenéticas destas espécies. Nos estudos genéticos utilizando
14 ferramentas como eletroforese de isoenzimas (Helgason et al. 1998; Vilas-Bôas et al. 2002),
15 seqüenciamento de genes codificantes de proteínas (Helgason et al. 2000b), polimorfismo de
16 comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP) (Ticknor et al. 2001; Hill et al. 2004), e a
17 técnica de tipagem de seqüências de multilocus (MLST) (Helgason et al. 2004), os resultados
18 são controversos, ora sugerindo estas espécies como unidades taxonômicas separadas, ora que
19 *B. anthracis* e *B. thuringiensis* sejam classificadas como subespécies de *B. cereus*.

20 A técnica de rep-PCR (polimorfismo de elemento repetitivo) descrita por Versalovic et
21 al. (1991) é baseada na existência de regiões de DNA repetitivo com número de ocorrência
22 variável em inúmeras bactérias (Lupski e Weinstock 1992). Iniciadores amplificam as
23 seqüências de DNA entre estas repetições, gerando um perfil de fragmentos de DNA que pode
24 ser utilizado em análises de relações genéticas entre bactérias (van Belkum et al. 1998). Esta
25 técnica tem sido utilizada também no grupo do *B. cereus* para a compreensão das relações
26 taxonômicas entre as três espécies que o compõe (Shangkuan et al. 2000; Kim et al. 2001;
27 Cherif et al. 2002; Cherif et al. 2003).

28 A utilização de populações simpátricas, as quais consistem de linhagens isoladas de
29 um mesmo local e tempo, para o estudo das questões taxonômicas entre *B. cereus* e *B.*
30 *thuringiensis* permite tanto a análise da similaridade genética intra e inter-específica quanto
31 inferências sobre a estrutura genética das populações estudadas (Vilas-bôas et al. 2002).

32 O objetivo deste estudo foi determinar as relações de similaridade genética entre as
33 populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* através da técnica de REP-PCR
34 (seqüências Repetitivas Palindrômicas Extragênicas) descrita por Versalovic et al. (1991).

1 MATERIAL E MÉTODOS

3 Amostragem e isolamento de linhagens

4
5 Foram coletadas seis amostras de solo em duas áreas (cerca de 100 m² cada)
6 localizadas em Londrina/PR, Brasil. A primeira área localizada em um fragmento de mata
7 subtropical, no Horto Florestal da Universidade Estadual de Londrina (chamada de área M) e
8 a segunda área localizada em região de pastagem da fazenda São João, (chamada área P),
9 separada da primeira área por uma distância de 5 km. Em cada área foram coletadas três
10 amostras de solo (denominadas M7, M8 e M9 para a área M e P1, P3 e P5 para a área P).

11 Linhagens de *B. cereus* e de *B. thuringiensis* foram isoladas de cada amostra de solo,
12 segundo método descrito por Ohba e Aizawa (1986). Para tanto, foram examinadas colônias
13 com morfologia semelhante àquelas apresentadas pelas bactérias que compõem o grupo do *B.*
14 *cereus*. Sob microscópio óptico, em objetiva de 100 X, foram identificadas células formadoras
15 de cristal protéico, classificadas como *B. thuringiensis*, e células formadoras apenas de
16 esporos, classificadas como *B. cereus*. Para cada amostra de solo foram isoladas 10 linhagens
17 de cada uma das duas espécies, exceto para as amostras M8, M9 e P5, das quais foram
18 isoladas apenas nove linhagens de *B. cereus*, totalizando 60 linhagens de *B. thuringiensis* e 57
19 de *B. cereus*.

20 O índice da presença de cada uma das espécies nas diferentes amostras de solo foi
21 calculado como a razão entre o número de linhagens de *B. thuringiensis* ou de *B. cereus*
22 identificadas e o número total de colônias analisadas para cada amostra de solo.

24 Teste de resistência ao antibiótico ampicilina

25
26 Este teste objetivou distinguir linhagens de *B. cereus* daquelas de *B. anthracis*,
27 eliminando da amostragem as prováveis linhagens de *B. anthracis*.

28 A resistência ou a sensibilidade ao antibiótico ampicilina foi determinada em placas
29 contendo meio Luria-Bertani (LB) (1% de tripton, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de
30 NaCl) acrescido de 10⁻¹ g l⁻¹ de ampicilina. O teste foi realizado em duplicata e todas as 117
31 linhagens foram inoculadas ao mesmo tempo e incubadas por 15 horas a 30°C.

32
33
34

1 **Extração de DNA genômico e REP-PCR**

2
3 A metodologia empregada à extração de DNA foi adaptada a partir do método descrito
4 por Sambrook et al. (1989). Linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* foram cultivadas por 15
5 h em 5 ml de LB líquido. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em
6 tampão contendo 10 mmol l⁻¹ de Tris e 1 mmol l⁻¹ de EDTA (TE) e tratadas com lisozima (5 g
7 l⁻¹) por 1 h a 37°C. Seguiu-se incubação com SDS (10%) e NaCl (1 mol l⁻¹) por 3 min e
8 tratamento com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (12 : 12 : 1). Após centrifugação, o DNA
9 foi precipitado com 2,5 volumes de etanol por 1 h, centrifugado e ressuspendido em TE. O
10 DNA foi quantificado em fluorímetro “DyNA Quant 200” (Hoefer), segundo as normas do
11 fabricante, utilizando DNA de *Calf Timus* (Pfizer) como padrão de concentração.

12 As reações de PCR foram realizadas com os iniciadores REP1R-I e REP2-I descritos
13 por Versalovic et al. (1991). Cada reação teve um volume final de 25 µL, contendo 100 ng de
14 DNA molde, 0,4 µmol l⁻¹ de cada um dos iniciadores, 0,2 mmol l⁻¹ de cada dNTP, 3mmol l⁻¹
15 de MgCl₂ e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California) em tampão
16 fornecido pelo fabricante. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador
17 Eppendorf Mastercycler Gradient usando um passo inicial de desnaturação (5 min a 94°C),
18 seguido de 40 ciclos compreendendo três passos (desnaturação por 1 min a 94°C, pareamento
19 por 1 min a 45°C e extensão por 4 min a 65°C). Ao final foram adicionados 6 min a 65°C de
20 extensão. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2 %
21 em tampão TEB (400 mmol l⁻¹ Tris, 100 mmol l⁻¹ EDTA, 10 mmol l⁻¹ Borato), corados com
22 brometo de etídeo (10 g l⁻¹) e fotografados sob luz UV. O marcador de tamanho de bandas de
23 DNA usado foi 1 Kb *ladder* (Invitrogen, Carlsbad, California).

24 25 **Análise da diversidade genética**

26
27 A diversidade genética apresentada por cada uma das populações foi avaliada por rep-
28 PCR usando o par de iniciadores REP1R-I e REP2-I. A reprodutibilidade dos padrões de
29 amplificação foi avaliada pela execução de diversas reações de amplificação para várias
30 linhagens usando DNA molde obtido de duas extrações de DNA independentes.

31 A análise comparativa dos géis foi feita a partir do alinhamento dos mesmos,
32 considerando cada marcador de tamanho de bandas de DNA como ponto de referência. Cada
33 banda de DNA observada foi verificada para todos os 116 linhagens e cada padrão de bandas
34 de DNA caracterizou um tipo eletroforético (ET).

1 As bandas de DNA identificadas para cada uma das amostras foram utilizadas para a
2 construção de uma matriz binária, na qual o valor zero representa a ausência da banda de
3 DNA para a linhagem analisada e um, a presença da banda de DNA. Esta matriz foi analisada
4 usando o algoritmo do Coeficiente de Similaridade de Jaccard, o qual não considera as
5 similaridades negativas, isto é, a ausência do produto. A escala de valores deste coeficiente
6 varia de zero, para dissimilaridade total, a um para similaridade total entre as linhagens. A
7 matriz de coeficientes de similaridade genética gerada foi utilizada para a obtenção de
8 agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means*),
9 para a construção de dendrogramas utilizando o programa de computador NTSYS-PC (ver
10 2.1) (Rohlf 2002).

11

12 RESULTADOS

13

14 Isolamento das populações simpátricas

15

16 A Tabela 1 apresenta a distribuição das 117 linhagens, 60 de *B. cereus* e 57 de *B.*
17 *thuringiensis* nas amostras de solo das áreas de mata e pastagem, tendo sido encontradas
18 colônias de ambas as espécies em todas as amostras de solo trabalhadas.

19 O número de colônias analisadas ao microscópio óptico e o índice da presença de
20 ambas as espécies em cada uma das amostras de solo é apresentado na Tabela 2. Em ambas as
21 áreas trabalhadas, os valores são muito semelhantes entre as médias estimadas da frequência
22 da presença das duas espécies (Bt-mata 0,082 *versus* Bc-mata 0,075; Bt-pastagem 0,136
23 *versus* Bc-pastagem 0,121). No entanto, nas amostras de solo provenientes da área de mata, o
24 índice da presença de ambas as espécies foi menor que aquele encontrado nas amostras de
25 solo provenientes da área de pastagem (Bt-mata 0,082 *versus* Bt-pastagem 0,136; Bc-mata
26 0,075 *versus* Bc-pastagem 0,121).

27 Na caracterização da resistência à ampicilina, que é um fenótipo típico destas duas
28 espécies, apenas quatro linhagens de *B. thuringiensis* (23, 56, 57 e 58) e uma linhagem de *B.*
29 *cereus* (85) apresentaram sensibilidade a ampicilina. Todas as demais linhagens apresentaram
30 resistência a este antibiótico. Para a caracterização genética foram utilizadas todas as
31 linhagens, com exceção da 85, que foi retirada dos testes por não ficar definida sua
32 classificação como pertencente à espécie *B. cereus* ou a *B. anthracis*.

33
34

Distribuição dos ETs nas duas áreas

A figura 1 apresenta alguns padrões de REP-PCR representativos das duas espécies estudadas. O número de bandas de DNA entre as linhagens variou de 1 a 11 e o aparente tamanho das bandas variou de 200 a quase 3000 pares de bases (pb).

O perfil das bandas de DNA apresentado pelas linhagens de *B. thuringiensis* foi bastante uniforme, estando a maioria das linhagens compreendidas no ET1. Este ET foi representado por quatro bandas principais, que variaram entre 350 e 1000 pb, aproximadamente. Nos demais ETs de *B. thuringiensis* (ET2, ET3, e ET4), compostos por 1, 8 e 1 linhagens, respectivamente, foram observadas a presença ou ausência de uma ou mais bandas, as quais tiveram seus tamanhos estimados entre 200 e 2500 pb.

Entre as linhagens de *B. cereus* puderam ser observados perfis de bandas altamente polimórficos, que permitiram a identificação de 38 ETs (ET5 a ET42) com uma variação de tamanhos aproximada de 200 a quase 3000 pb. Nenhum ET pode ser identificado como representante característico de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Tabela 3).

Em *B. thuringiensis* o ET1 foi comum em 50 das 60 linhagens trabalhadas, enquanto que os ETs 2 e 4 foram encontrados apenas na área de pastagem e o ET3 apenas na área de mata. Em *B. cereus* o ET42 representa 14 das 56 linhagens (11 da pastagem e três da mata). Os outros 37 ETs representaram um baixo número de linhagens (no máximo três), sempre provenientes de uma única área.

Análise da diversidade genética intra e inter-específica

Considerando que linhagens classificadas dentro do mesmo ET podem ser consideradas como prováveis clones, inicialmente foram avaliadas as relações de similaridade genética entre os 42 ETs (Figura 2). A análise do dendrograma demonstra que os índices de similaridade genética variaram de 1 a 90%, aproximadamente, e que a distribuição das seqüências REP em *B. thuringiensis*, destacados na figura com setas, tende a ser menos variável, havendo uma tendência para o agrupamento dos ETs específicos de *B. thuringiensis*.

A estrutura genética das populações de ambas as espécies, em cada uma das áreas trabalhadas, foi analisada através de dois dendrogramas de similaridade genética contendo todas as linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis*: o primeiro com as linhagens provenientes da área de mata e o segundo com as linhagens provenientes da área de pastagem.

1 O dendrograma de similaridade genética, gerado a partir de 30 linhagens de *B.*
2 *thuringiensis* e de 27 linhagens de *B. cereus* provenientes da área de mata (Figura 3),
3 apresentou uma clara divisão entre as duas espécies. O grupo I é formado por quatro
4 agrupamentos contendo seis ETs, sendo os dois mais representativos compostos por 22 e oito
5 linhagens de *B. thuringiensis*, respectivamente, apresentando 80% de similaridade genética.
6 Os quatro ETs restantes são todos representados cada um por uma linhagem de *B. cereus*
7 (linhagens 67, 66, 68 e 69), com a linhagem 67 apresentando 64% de similaridade genética
8 com os agrupamentos de *B. thuringiensis* e as outras três linhagens apresentando 50% de
9 similaridade genética com estes mesmos agrupamentos. Este grupo I apresenta cerca de 40%
10 de similaridade genética com o grupo II, que é constituído por 23 linhagens de *B. cereus*,
11 podendo-se observar 18 ETs com níveis de similaridade genética variando entre
12 aproximadamente um e 100%.

13 O dendrograma de similaridade genética, gerado a partir de 30 linhagens de *B.*
14 *thuringiensis* e de 29 de *B. cereus* provenientes da região de pastagem (Figura 4), apresentou
15 a mesma característica que o dendrograma anterior. A um nível de similaridade genética de
16 cerca de 40%, pode-se distinguir dois grupos. O grupo I é formado por quatro ETs, com o
17 primeiro ET sendo composto por 28 linhagens de *B. thuringiensis*, o segundo ET formado por
18 duas linhagens de *B. cereus* (linhagens 91 e 92), o terceiro ET por uma única linhagem de *B.*
19 *thuringiensis* (linhagem 60) e o quarto ET por uma linhagem de *B. cereus* (linhagem 101). No
20 grupo II podem ser distinguidos 17 ETs, sendo um destes representado pela linhagem 52 de *B.*
21 *thuringiensis* e o restante exclusivamente por representantes da espécie *B. cereus*.

22

23 **DISCUSSÃO**

24

25 No isolamento de populações simpátricas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* nas áreas de
26 mata e pastagem, diferentes pontos devem ser destacados: (i) ambas as espécies de *Bacillus*
27 foram isoladas de todas as amostras de solo das duas áreas trabalhadas; (ii) os índices da
28 presença relativa das duas espécies foram similares nas várias amostras de solo provenientes
29 de ambas as áreas (índice *B. cereus/B. thuringiensis*, ~1:1) e, (iii) nas amostras de solo
30 provenientes da mata foram encontrados menores índices da presença de ambas as espécies
31 em relação aos índices encontrados nas amostras de solo provenientes da pastagem.

32 Até o momento, somente o trabalho de Vilas-Bôas et al. (2002) analisou ao mesmo
33 tempo a presença de *B. cereus* e *B. thuringiensis* em amostras de solo e encontrou uma
34 frequência 10 vezes menor para a presença de *B. thuringiensis*. Diversos trabalhos têm

1 analisado o índice da presença de *B. thuringiensis* em amostras de solo provenientes de áreas
2 de floresta e áreas agrícolas (Martin e Travers 1989; Chilcott e Wigley 1993; Vilas-Bôas e
3 Lemos 2004), e os índices encontrados ora são maiores em áreas agrícolas (Martin e Travers
4 1989; Vilas-Bôas e Lemos 2004), ora são maiores em áreas de floresta (Chilcott e Wigley
5 1993). Assim, podemos considerar que esses índices podem ser resultados de uma complexa
6 rede de fatores ambientais bióticos e abióticos que incluem a microbiota do solo, tipo de
7 insetos encontrados nas áreas amostradas, tipo de cobertura vegetal, pH e textura do solo,
8 disponibilidade de nutrientes e oxigênio.

9 Neste trabalho foi avaliada a sensibilidade ao antibiótico ampicilina, que é uma
10 característica típica de linhagens de *B. anthracis* e que pode ser utilizada para rapidamente
11 distinguir linhagens desta bactéria daquelas de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, as quais são
12 resistentes a este antibiótico (Slamti et al. 2004). Assim, considerando que neste estudo foi
13 encontrada uma linhagem de *B. cereus* e quatro linhagens de *B. thuringiensis* sensíveis a este
14 antibiótico, pode-se considerar que, com exceção da linhagem 85 de *B. cereus*, todas as
15 demais linhagens empregadas neste estudo seguramente não pertencem à espécie *B. anthracis*,
16 ou por apresentarem a formação de cristal protéico (característica típica de *B. thuringiensis*)
17 ou por apresentarem a resistência a este antibiótico (característica jamais relatada em uma
18 linhagem de *B. anthracis*). Desta forma, a linhagem 85 foi excluída das análises genéticas por
19 não ficar claro seu posicionamento taxonômico como *B. cereus* ou *B. anthracis*. As cinco
20 linhagens sensíveis a ampicilina poderão ser investigadas posteriormente para confirmar se a
21 sensibilidade a este antibiótico é decorrente de mutações no promotor pleiotrópico *plcR*,
22 conforme descrito por Slamti et al. (2004).

23 A análise do dendrograma das relações de similaridade genética contendo os 42 ETs
24 (Figura 2), demonstra uma grande semelhança entre as duas espécies. No dendrograma pode-
25 se observar que aproximadamente 30 dos 42 ETs apresentam similaridade genética maior que
26 50% entre si. Os ETs 1, 2 e 3, correspondentes às linhagens de *B. thuringiensis*,
27 demonstraram tendência a se agruparem, com exceção do ET4, que apresentou maior
28 similaridade genética aos outros representantes de *B. cereus* do que aos de *B. thuringiensis*.
29 No entanto, quando observamos os dendrogramas correspondentes ao agrupamento das
30 populações simpátricas (Figuras 3 e 4), podemos verificar a formação de agrupamentos entre
31 as linhagens de *B. thuringiensis*, estando as mesmas sempre localizadas dentro do grupo I nas
32 duas figuras, e as linhagens de *B. cereus* demonstram alta variabilidade genética, estando a
33 maioria das linhagens localizadas no grupo II das duas figuras.

1 De acordo com o modelo de estruturas genéticas de populações de bactérias proposto
2 por Smith et al. (1993), ainda amplamente aceito, a despeito da grande semelhança genética
3 existente entre estas espécies, as populações simpátricas aqui analisadas apresentaram
4 estruturas genéticas populacionais distintas, com populações de *B. thuringiensis* apresentando
5 uma forte tendência à estrutura genética populacional clonal, permitindo a identificação de
6 poucos genótipos altamente freqüentes. Esta tendência não é demonstrada pelas linhagens de
7 *B. cereus*, as quais não apresentaram grandes agrupamentos, com exceção do ET42 que
8 apresentou 11 linhagens na região de pastagem e três linhagens na região de mata. Este ET
9 possivelmente foi originado pela multiplicação preferencial desta linhagem em relação às
10 demais linhagens desta espécie que estavam presentes nestas amostras de solo, evidenciando
11 um tipo de estrutura populacional chamada estrutura epidêmica, a qual, segundo Smith,
12 (2000), é composta de duas partes: (i) um grande número de genótipos relativamente raros e
13 não relacionados entre si, que trocam material genético a uma alta freqüência; (ii) um número
14 limitado de genótipos ou grupos de genótipos altamente freqüentes, os quais são considerados
15 como complexos clonais que emergem a partir de um único genótipo altamente adaptado.

16 Os diferentes padrões de bandas apresentados pelas linhagens de *B. cereus* sugerem
17 que as linhagens desta espécie são caracterizadas por um genoma relativamente variável, o
18 que sugere a ocorrência de transferência genética tanto intra-específica quanto inter-
19 específica. Resultados similares foram anteriormente descritos por Vilas-Bôas et al. (2002) e
20 Cherif et al. (2003). Embora as linhagens de *B. thuringiensis* tenham sido classificadas em
21 somente quatro ETs, o método de REP-PCR já foi utilizado anteriormente (Phucharoen et al.
22 1999), sendo considerado com alto poder discriminativo entre as linhagens desta espécie, o
23 que reforça as diferenças dos tipos de estrutura genética populacionais apresentados pelas
24 duas espécies neste estudo.

25 Estes resultados demonstram que as análises genéticas realizadas com estas duas
26 espécies devem ser feitas levando-se em consideração a estrutura populacional. Assim, se nós
27 observarmos apenas o dendrograma da Figura 2, que não considera a simpatria entre as
28 bactérias, iremos constatar a grande similaridade genética entre estas duas espécies,
29 evidenciada pela topologia do dendrograma, onde os ETs correspondentes às linhagens de *B.*
30 *thuringiensis* encontram-se misturados com os ETs correspondentes às linhagens de *B.*
31 *cereus*, o que sugere a classificação como uma única espécie. No entanto, ao observarmos os
32 dendrogramas das Figuras 3 e 4, podemos constatar que a despeito da similaridade genética
33 entre estas duas espécies, as mesmas diferem consideravelmente em relação a estrutura
34 populacional, com a espécie *B. thuringiensis* apresentando uma tendência a clonalidade, não

1 sendo a mesma tendência apresentada por *B. cereus*, o que pode ser levado em consideração
2 para a manutenção da atual classificação como duas espécies diferentes.

3 A avaliação da estrutura populacional é um importante alvo de inúmeros estudos
4 envolvendo o grupo de *B. cereus* (Helgason et al. 2000a; Vilas-Bôas et al. 2002; Ko et al.
5 2004; Priest et al. 2004; Barker et al. 2005). Considerando que o conceito de espécie em
6 bactérias está em debate (Cohan 2002; Rossello-Mora 2003), e que a especiação em bactérias
7 requer somente divergência ecológica, ao contrário dos eucariontes superiores que requerem
8 também a divergência reprodutiva (Cohan 1994), a tendência parece ser que a sistemática de
9 bactérias considere uma espécie como sendo mais que um agrupamento de organismos
10 geneticamente similares. Assim, aspectos ecológicos como o nicho da bactéria no ambiente, a
11 íntima conexão entre a resposta a fatores ambientais e a origem da bactéria e a manutenção da
12 variabilidade genética também são importantes. Desta forma, para evoluirmos na questão,
13 especial atenção deverá ser devotada tanto aos estudos de seqüenciamento de genomas e
14 genômica funcional envolvendo microarranjos de DNA e proteômica, que irão permitir
15 entender a dinâmica da evolução do genoma nestas espécies, quanto aos estudos envolvendo a
16 ecologia, a genética de populações e aos aspectos evolutivos que dirigem a origem e o destino
17 da diversidade genética nestas espécies.

1 REFERÊNCIAS

- 2
- 3 Barker, M., Thakker, B. e Priest, F.G. (2005) Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus*
4 *cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS*
5 *Microbiol Lett* **245**, 179-184.
- 6
- 7 Cherif, A., Borin, S., Rizzi, A., Ouzari, H., Boudabous, A. e Daffonchio, D. (2002)
8 Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction
9 chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *J Appl*
10 *Microbiol* **93**, 456-462.
- 11
- 12 Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H. e Daffonchio,
13 D. (2003) Genetic Relationship in the ‘*Bacillus cereus* group’ by rep-PCR fingerprinting and
14 sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J Appl Microbiol* **94**, 1108-
15 1119.
- 16
- 17 Chilcott, C.N. e Wigley, P.J. (1993) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil
18 and insect habitats in New Zealand. *J Invertebr Pathol* **61**, 244-247.
- 19
- 20 Cohan, F.M. (1994) The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary
21 divergence in prokaryotes. *Am Nat* **143**, 965-986.
- 22
- 23 Cohan, F.M. (2002) What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* **56**, 457-487.
- 24
- 25 Drobniewski, F.A. (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**, 324-338.
- 26
- 27 Helgason, E., Caugant, D.A., Lecadet, M.M., Chen, Y., Mahillon, J., Lövgren, A., Hegna, I.,
28 Kvaløy, K. e Kolstø, A.-B. (1998) Genetic Diversity of *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis*
29 Isolates from Natural Sources. *Curr Microbiol* **37**, 80-87.
- 30
- 31 Helgason, E., Caugant, D.A., Olsen, I. e Kolstø, A.-B. (2000a) Genetic structure of population
32 of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human
33 infections. *J Clin Microbiol* **38**, 1615-1622.
- 34

- 1 Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. e
2 Kolstø, A.-B. (2000b) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one
3 species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2627-2630.
4
- 5 Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A. e Kolstø, A.-B. (2004) Multilocus
6 sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* **70**,
7 191-201.
8
- 9 Hill, K.K., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K.A., Laker, M.,
10 Pardington, P.E., Richardson, A.P., Tonks, M., Beecher, D.J., Kemp, J.D., Kolstø, A.-B.,
11 Wong, A.C.L., Keim, P. e Jackson, P.J. (2004) Fluorescent Amplified Fragment Length
12 Polymorphism Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*
13 Isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1068–1080.
14
- 15 Kim, W., Hong, Y.-P., Yoo, J.-H., Lee, W.-H., Choi, C.-S. e Chung, S.-I. (2001) Genetic
16 relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number
17 tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol Lett* **207**, 21-
18 27.
19
- 20 Ko, K.S., Kim, J.-W., Kim, J.-M., Kim, W., Chung, S., Kim, I.J. e Kook, Y.-H. (2004)
21 Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six
22 housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infect Immun* **72**, 5253-5261.
23
- 24 Kotiranta, A., Lounatmaa, K. e Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of
25 *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* **2**, 189-198.
26
- 27 Lupski, J.R. e Weinstock, G.M. (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in
28 prokaryotic genomes. *J Bacteriol* **174**, 4525-4529.
29
- 30 Martin, P.A.W. e Travers, R.S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus*
31 *thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2437-2442.
32
- 33 Ohba, M. e Aizawa, K. (1986) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J*
34 *Invertebr Pathol* **47**, 277-282.

- 1 Phucharoen, K., Chungjatupornchai, W. e Panyim, S. (1999) Differentiation of *Bacillus*
2 *thuringiensis* subspecies using repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) genomic
3 fingerprinting. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol* **7**, 79-83.
- 4
- 5 Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W.J., Holmes, E.C. e Maiden, M.C.J. (2004) Population
6 structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **186**, 7959-7970.
- 7
- 8 Rohlf, F.J. (2002) NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.1. Exeter Publishing,
9 Ltd. Setauket, NY.
- 10
- 11 Rossello-Mora, R. (2003) Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept?
12 *Sys Appl Microbiol* **26**, 323-326.
- 13
- 14 Sambrook, J.; Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a
15 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 16
- 17 Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rien, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. e
18 Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol*
19 *Biol Rev* **62**, 775-806.
- 20
- 21 Shangkuan, Y.-H., Yang, J.-F., Lin, H.-C. e Shaio, M.-F. (2000) Comparison of PCR-RFLP,
22 ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J Appl*
23 *Microbiol* **89**, 452-462.
- 24
- 25 Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M., Vilas-Bôas, G., Fouet, A., Mock, M., Sanchis, V.,
26 Chaufaux, J., Gohar, M. e Lereclus, D. (2004) Distinct mutations in PlcR explain why some
27 strains of *Bacillus cereus* group are non-hemolytic. *J Bacteriol* **186**, 3531-3538.
- 28
- 29 Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M, e Spratt, B.G. (1993) How clonal are bacteria? *Proc*
30 *Natl Acad Sci USA* **90**, 4384-4388.
- 31
- 32 Smith, J.M., Feil, E.J. e Smith, N.H. (2000) Population structure and evolutionary dynamics
33 of pathogenic bacteria. *BioEssays* **22**, 1115-1122.
- 34

- 1 Ticknor, L.O., Kolstø, A.-B., Hill, K., Keim, P., Laker, M.T., Tonks, M. e Jackson, P.J.
2 (2001) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus*
3 *cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4863-4873.
4
- 5 van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L. e Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA
6 repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 275-293.
7
- 8 Versalovic, J., Koeuth, T. e Lupski, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in
9 eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **24**, 6823-
10 6831.
11
- 12 Vilas-Bôas, G.T. e Lemos, M.V.F. (2004) Diversity of *cry* genes and genetic characterization
13 of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Can J Microbiol* **50**, 605-613.
14
- 15 Vilas-Bôas, G.T., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F. e Bourguet, D. (2002) Genetic
16 differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.
17 *Appl Environ Microbiol* **68**, 1414-1424.

1 **Tabela 1.** Distribuição das 57 linhagens de *B. cereus* e das 60 linhagens de *B. thuringiensis*
 2 isoladas nas áreas de mata (Horto Florestal da UEL) e pastagem (Fazenda São João)
 3 localizadas em Londrina/PR, Brasil.

Linhagens	Áreas						Total
	Mata			Pastagem			
	M ₇	M ₈	M ₉	P ₁	P ₃	P ₅	
<i>B. thuringiensis</i>	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	60
<i>B. cereus</i>	61-70	71-79	80-88	89-98	99-108	109-117	57
Total	20	19	19	20	20	19	117

5
6
7
8
9
10

11 **Tabela 2.** Número total de colônias analisadas e índice da presença de *B. cereus* e *B.*
 12 *thuringiensis* nas seis amostras de solo provenientes das áreas de mata (M7, M8 e M9) e
 13 pastagem (P1, P3 e P5). O índice da presença é calculado pela razão entre número de colônias
 14 indetificadas e o total de colônias analisadas para cada amostra de solo.

15

Amostras de solo	Total de colônias	Índice da presença	
		<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>
M ₇	142	0,085	0,092
M ₈	169	0,089	0,083
M ₉	178	0,073	0,051
Média	163	0,082	0,075
P ₁	106	0,123	0,113
P ₃	77	0,156	0,143
P ₅	92	0,130	0,109
Média	91,6	0,136	0,121

16

1 **Tabela 3.** Distribuição dos ETs encontrados entre as 60 linhagens de *B. thuringiensis** e as 56
 2 linhagens de *B. cereus*† provenientes das áreas de mata e pastagem.

3

ETs	Áreas		Total	ETs	Áreas		Total
	Mata	Pastagem			Mata	Pastagem	
1	22	28	50	23	1	0	1
2	0	1	1	24	0	1	1
3	8	0	8	25	0	2	2
4	0	1	1	26	1	0	1
5	1	0	1	27	0	1	1
6	1	0	1	28	1	0	1
7	0	1	1	29	1	0	1
8	0	1	1	30	0	1	1
9	0	1	1	31	0	1	1
10	0	1	1	32	0	1	1
11	0	1	1	33	0	1	1
12	1	0	1	34	2	0	2
13	1	0	1	35	1	0	1
14	0	2	2	36	0	1	1
15	1	0	1	37	1	0	1
16	1	0	1	38	1	0	1
17	0	1	1	39	1	0	1
18	3	0	3	40	1	0	1
19	1	0	1	41	0	1	1
20	1	0	1	42	3	11	14
21	1	0	1				
22	1	0	1				

4

5 *ETs 1 a 4. †ETs 5 a 42.

1 **Legendas das Figuras**

2

3 **Figura 1.** a) Perfis do DNA das linhagens de *B. thuringiensis* amplificados pelos iniciadores
 4 REP1R-I e REP2-I, em gel de agarose 2,0%; b) Perfis do DNA das linhagens de *B. cereus*
 5 amplificados pelos iniciadores REP1R-I e REP2-I, em gel de agarose 2,0%; os números das
 6 canaletas equivalem aos isolados de *B. thuringiensis* e *B. cereus*; canaletas: (CN) controle
 7 negativo; (M) padrão de tamanho de bandas de DNA (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen;
 8 Carlsbad, California).

9

10 **Figura 2.** Dendrograma de similaridade genética entre os 42 ETs identificados (4 de *B.*
 11 *thuringiensis* e 38 de *B. cereus*). O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA a partir
 12 de uma matriz de coeficientes de similaridade genética obtida pelo algoritmo de Jaccard. (△)
 13 *B. thuringiensis* de mata, (▲) *B. thuringiensis* de pastagem, (○) *B. cereus* de mata e (●) *B.*
 14 *cereus* de pastagem. As setas indicam os quatro ETs observados nos 60 isolados de *B.*
 15 *thuringiensis*.

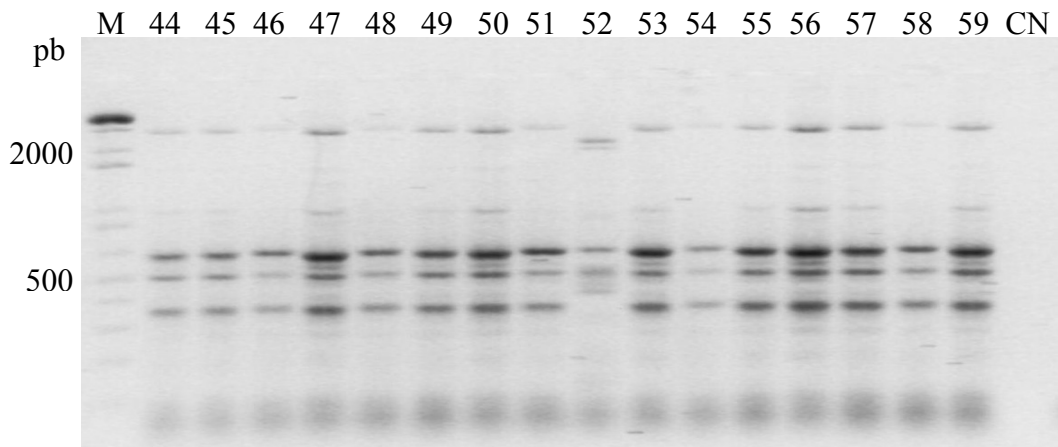
16

17 **Figura 3.** Dendrograma de similaridade genética entre as linhagens de *B. thuringiensis* (1-30)
 18 e de *B. cereus* (61-88), provenientes da área de mata. O agrupamento foi realizado pelo
 19 método UPGMA a partir de uma matriz de coeficientes de similaridade genética obtida pelo
 20 algoritmo de Jaccard. Grupo I representa todas as linhagens de *B. thuringiensis* e quatro
 21 linhagens de *B. cereus* (66, 67, 68, 69). Grupo II representa apenas linhagens de *B. cereus*.

22

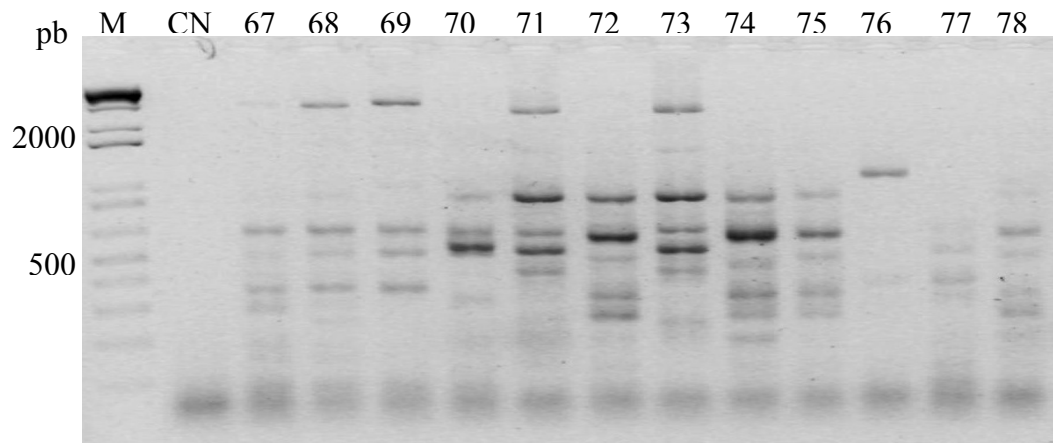
23 **Figura 4.** Dendrograma de similaridade genética entre as linhagens de *B. thuringiensis* (31-
 24 60) e de *B. cereus* (89-117), provenientes da área de pastagem. O agrupamento foi realizado
 25 pelo método UPGMA a partir de uma matriz de coeficientes de similaridade genética obtida
 26 pelo algoritmo de Jaccard. Grupo I representa as linhagens de *B. thuringiensis* e três linhagens
 27 de *B. cereus* (91, 92 e 101). Grupo II representa as linhagens de *B. cereus* e uma linhagem de
 28 *B. thuringiensis* (52).

29



1

a)

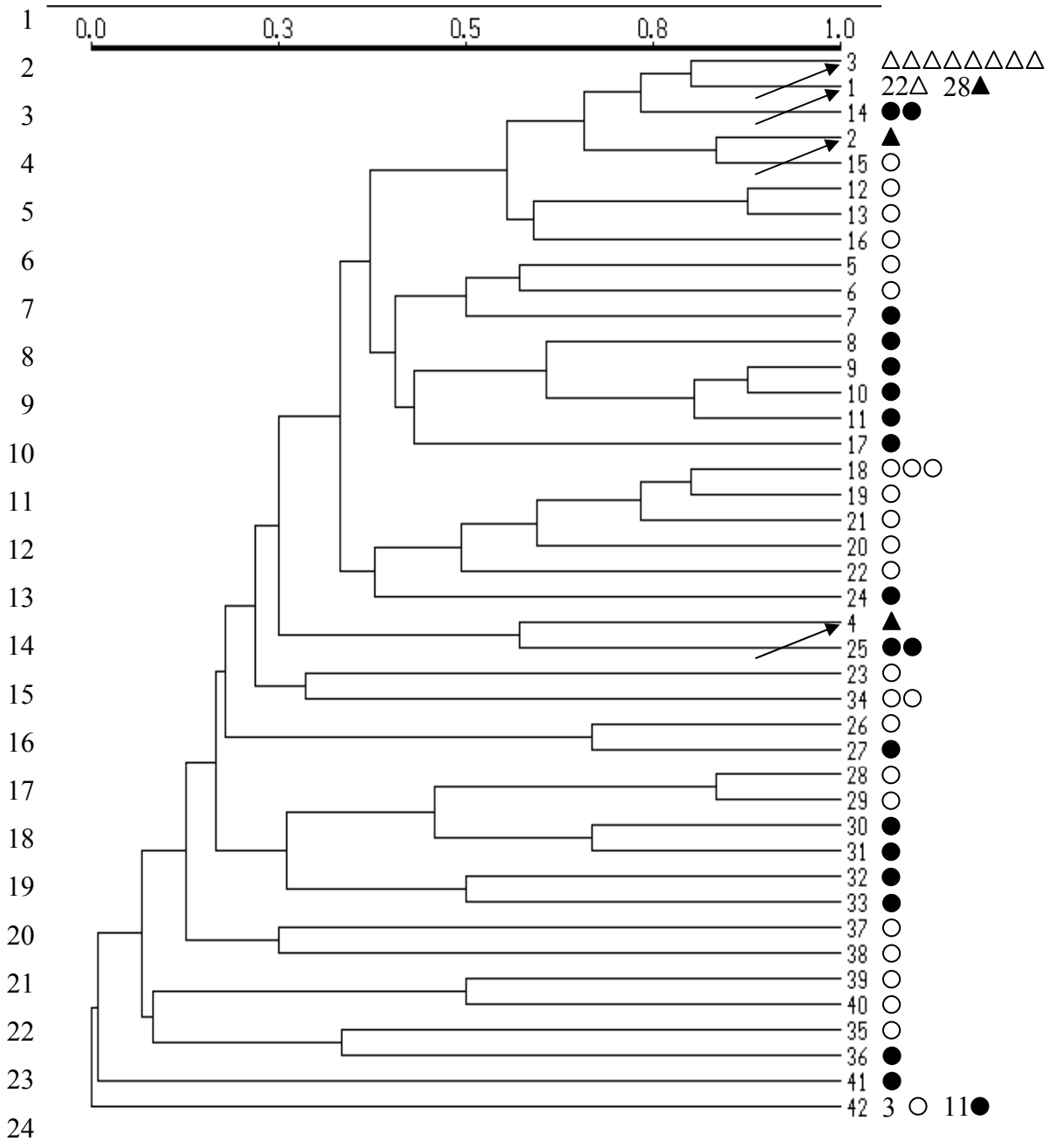


2

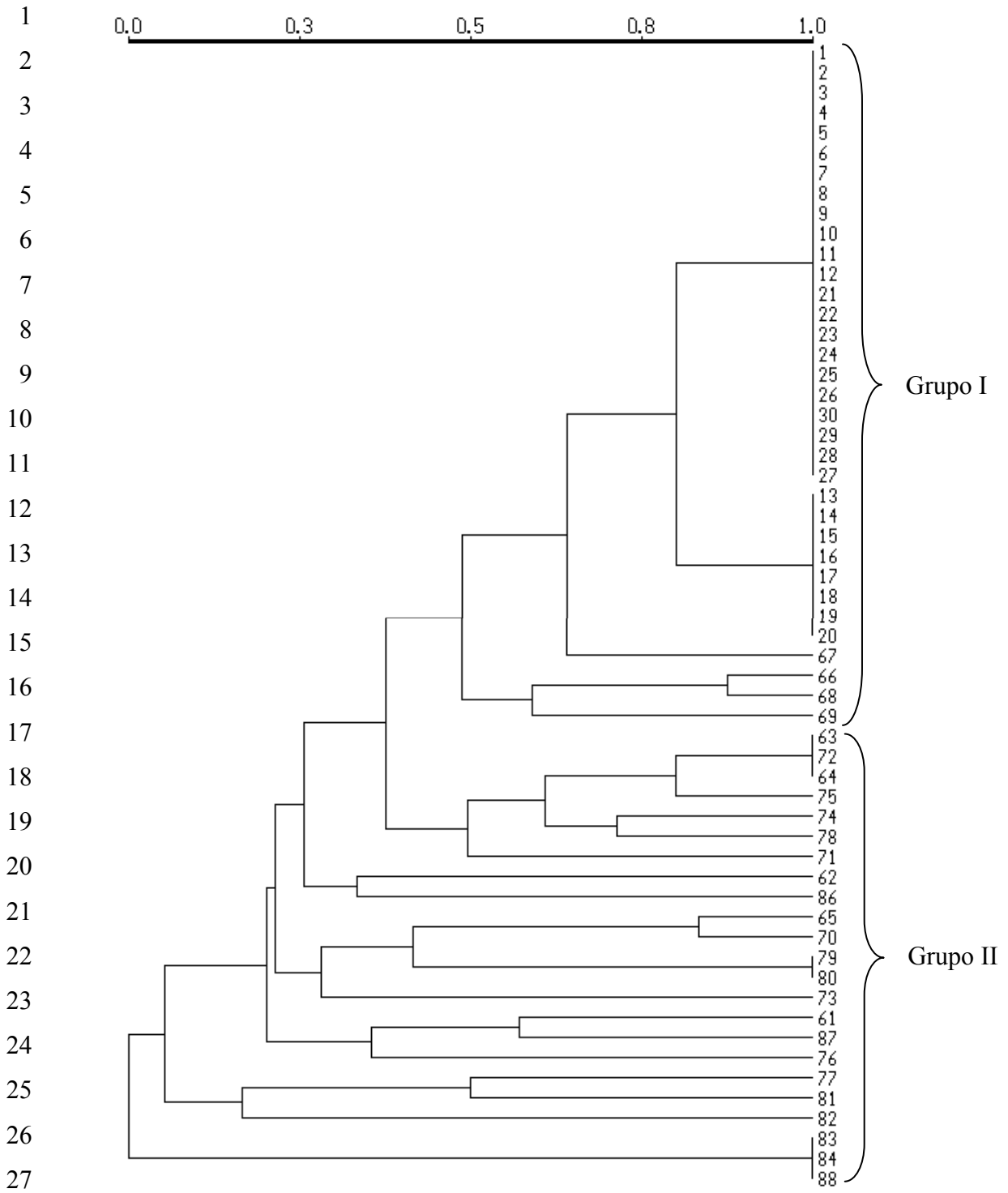
b)

3

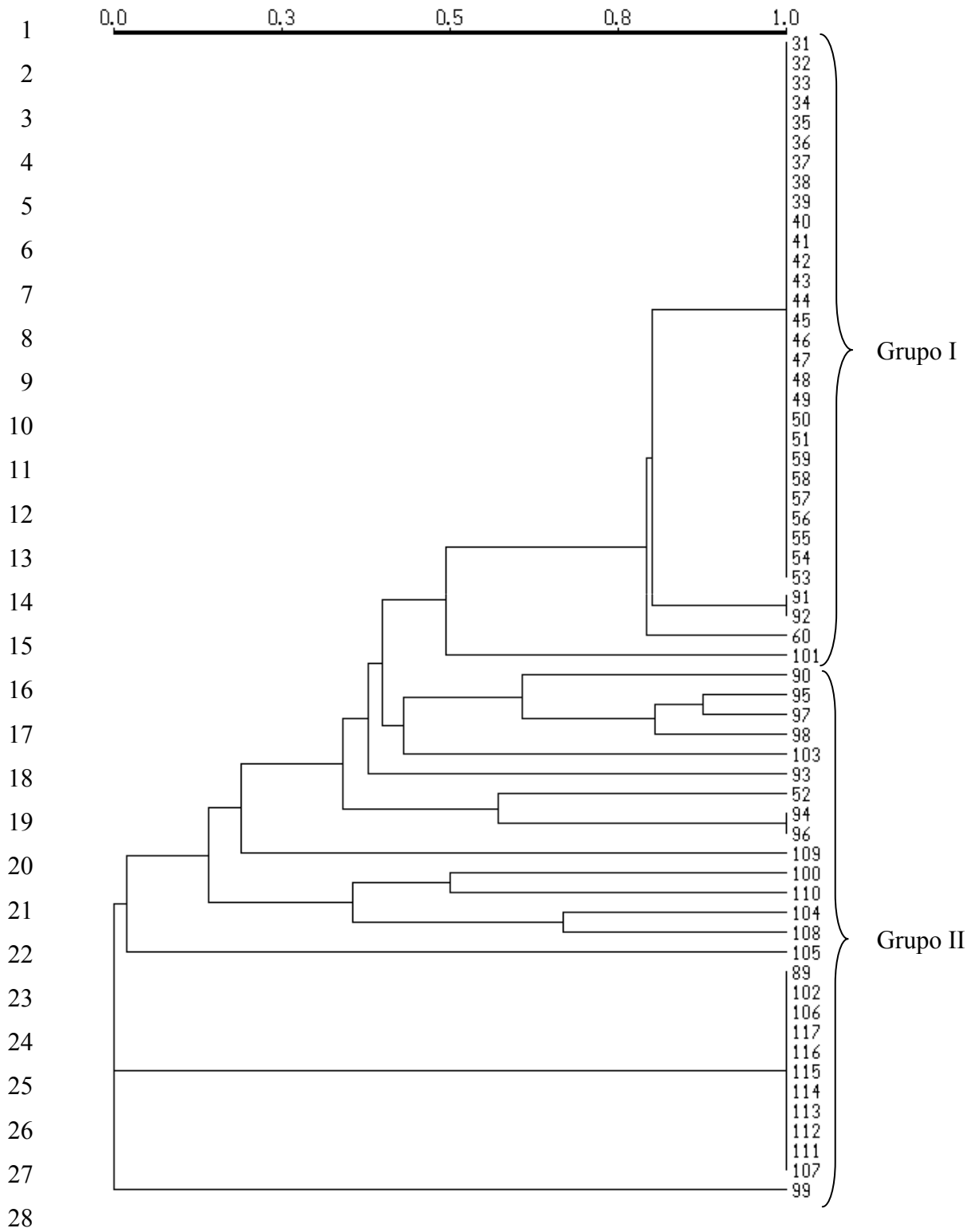
4 **Figura 1.**



25 **Figura 2.**



28 **Figura 3.**



29 **Figura 4.**

4. ARTIGO 2: Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*.

Este artigo foi submetido para publicação na revista *Journal of Applied Microbiology*.

1
2
3
4 **Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus***
5 ***thuringiensis***
6
7
8
9

10 G.T. Vilas-Bôas^{1*}, A.P.S. Peruca¹ and O.M.N. Arantes¹
11
12
13

14 ¹ Departamento de Biologia Geral, CCB, UEL, CP 6001, Londrina/PR, 86051-990, Brazil.
15
16
17
18

19 Abbreviated Title: *B. cereus* group: Biology and taxonomy
20
21
22
23
24

25 * *Corresponding author:*

26 Mailing address: Departamento de Biologia Geral, CCB, UEL, CP 6001, Londrina/PR,
27 86051-990, Brazil. Phone: (55) 43 3371 4527. Fax: (55) 43 3328 4440. E - mail:
28 gvboas@uel.br
29
30
31
32
33

1 **ABSTRACT**

2

3 Three species of the *Bacillus cereus* group, *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*
 4 have a marked impact on human activity. *B. cereus* and *B. anthracis* are important pathogens
 5 of mammals, including humans, and *B. thuringiensis* is extensively used in biological control
 6 of insects. The microbiological, biochemical and genetic characteristics of these three species
 7 are reviewed, together with a discussion of several genomic studies conducted on strains of *B.*
 8 *cereus* group. Using bacterial systematic concepts, we speculate that to understand the
 9 taxonomic relationship within this group of bacteria, special attention should be devoted also
 10 to the ecology and the population genetics of these species.

11

12

13 **Keywords:** *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, taxonomy,
 14 bacterial systematic, species concept.

15

16

17 **CONTENTS**

18 **1. INTRODUCTION.....70**

19 **2. *B. CEREUS*, THE MODEL SPECIES.....71**

20 **3. *B. ANTHRACIS* AND ANTHRAX.....75**

21 **4. *B. THURINGIENSIS*, CHARACTERISTICS AND BIOTECHNOLOGICAL**
 22 **USE.....78**

23 **5. TAXONOMY OF THE *B. CEREUS* GROUP.....82**

24 **6. CONCLUSION.....87**

25 **7. ACKNOWLEDGEMENTS.....89**

26 **8. REFERENCES.....89**

1. INTRODUCTION

Despite important advances in the field of molecular biology due to the introduction of new tools for genetic analyses, bacterial systematic still has not reached a consensus regarding their definition of the “fundamental unit of biological diversity”, the species.

For taxonomists working on higher organisms such as plants and animals, the species concept has changed over time. First, species were identified as set of organisms sharing similar phenotypic traits, particularly morphology. This concept evolved to envision species as a cluster of similar organisms, which were seen as a fundamental unit of ecology and evolution (Cohan 2002). According to the widely accepted biological concept, a species is a taxonomic unit formed by groups of interbreeding natural populations that are reproductively isolated from other such groups (Mayr 1996). In a very basic biological sense, a species is a protected genic set (or genome), a population that developed adaptations and isolating mechanisms to protect their genetic heritage against the introduction of genes from other organisms.

The concept that has been adopted in bacterial systematic originated from the one applied to higher organisms. Therefore, bacteria were initially classified using morphological and biochemical traits. Later, with the advent of molecular biology techniques starting in the 70s, molecular data started to be used in the classification of bacteria. At first, whole genome DNA-DNA hybridization was used as the standard method, with a minimum of 70% of hybridization between genomes being necessary for two bacteria to be considered as belonging to the same species. Currently, in the addition to DNA-DNA hybridization, nucleotide variation in the 16S rDNA has also been used in bacterial taxonomy, where a 3% divergence would characterize two bacteria as belonging to different species (Cohan 2002). These genes are accepted as molecular chronometer because it is functionally constant, shows a mosaic structure of conserved and more variable regions and because of its universal presence (Woese 1987).

Following all these changes, the classification of different species into a variety of bacterial taxa has been continuously modified in a very dynamical fashion. This phenomenon can be observed in the *Bacillus cereus* group, which includes six very closely related species: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides* e *B. weihenstephanensis*. Recent studies have suggested that *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*

1 and *B. thuringiensis* should be considered as members of a single species, *B. cereus sensu lato*
2 (Daffonchio et al. 2000; Helgason et al. 2000a; Helgason et al. 2000b; Bavykin et al. 2004).
3 However, other studies have obtained the discrimination among *B. anthracis*, *B. cereus* and *B.*
4 *thuringiensis* (Harrel et al. 1995; Keim et al. 1997; Chang et al. 2003; Radnedge et al. 2003)
5 and the genetic differentiation of *B. cereus* and *B. thuringiensis* (Vilas-Bôas et al. 2002;
6 Cherif et al. 2003).

7 Formerly, these species were classified as distinct due to the great relevance of their
8 phenotypical differences, which form the basis for their classification. Thus, cells of *B.*
9 *anthracis* are capable of capsule formation and the production of toxins that lead to
10 carbuncles in animals and in humans, causing the disease known as anthrax. Cells of *B.*
11 *thuringiensis* form a parasporal crystal that is active on larvae of a variety of insect orders,
12 allowing the use of products based on this bacterium for biological control. Finally, cells of *B.*
13 *cereus* lack both of those characteristics and can cause food contamination. Later, however,
14 the comparison of nucleotide sequences of 16S rDNA of those species showed less than 1%
15 divergence between them (Ash et al. 1991a), but a cutoff of 3% divergence is recommended
16 as a conservative criterion for demarcating species, supporting the suggestion as a single
17 species. Therefore, the sequences of 16S rDNA and the phenotypical traits are some of the
18 main factors that give rise to the phylogenetic discussions about the classification of these
19 species.

20 In this paper the microbiological, biochemical and genetic characteristics of these three
21 species are reviewed, together with a discussion of the most recent advances in the
22 understanding of the taxonomic relationships within this group of bacteria. Inconveniences
23 caused by *B. cereus* on food industries are also addressed, as well as characteristics of anthrax
24 and the biotechnological application of *B. thuringiensis*.

25

26 **2. *B. cereus*, THE MODEL SPECIES**

27

28 *B. cereus* is a Gram-positive, aerobic, facultative anaerobic, spore forming bacterium
29 that is mobile through peritrichous flagella. It is a mesophile bacterium, with growth
30 temperatures varying between 10 and 48°C, and showing optimal growth between 28 and
31 35°C. It is a ubiquitous species, living as a soil saprophyte but also being found in food of
32 plant and animal origin, particularly in dairy products (Granum and Baird-Parker 2000).
33 Colonies of this species are irregular, use glucose as a source of carbon (but not mannitol,

1 arabinose or xylose), hydrolyze starch and gelatin, show hemolytic activity, are resistant to
2 ampicillin and show pronounced lecithinase activity (Schraft and Griffiths 1995).

3 The capacity of this species to grow on food can cause serious problems to the food
4 industry, particularly in the dairy products. The presence of this bacterium can cause changes
5 in texture or the development of off-flavours due to the multiplication of vegetative cells or
6 the production of toxins. The final outcome of this process is food poisoning, potentially
7 causing vomiting or diarrhea (at times both). These symptoms can initiate a few hours after
8 the ingestion of contaminated food, depending on whether the type of toxin is emetic,
9 (produced by growing cells in the food) or diarrheal (produced during vegetative growth of *B.*
10 *cereus* in small intestine) (Granum and Lund 1997). Table 1 describes some of the
11 characteristics of food poisoning by *B. cereus*.

12 *B. cereus* is a common food poisoning organism, but occasionally is also implicated in
13 systemic and local infections, especially associated with immunologically compromised
14 patients, neonates and drug addicts (Kotiranta et al. 2000). For example, it is responsible for a
15 severe form of endophthalmitis which may result in loss of functional vision or even
16 blindness (Callegan et al. 2002), bacteremia (Ginsburg et al. 2003; Hilliard et al. 2003),
17 meningitis, pneumonia, urinary tract infections and fatal fulminant liver failure (reviewed in
18 Kotiranta et al. 2000).

19 *B. cereus* strains secrete a battery of extracellular enzymes and toxins that are supposed
20 to be important factors for its pathogenicity. Two three component enterotoxins, HBL and
21 NHE, are currently regarded as etiological causes of diarrheal food poisoning infections due
22 to *B. cereus*. Hemolytic, cytotoxic and dermonecrotic activity, vascular permeability, and
23 fluid accumulation in ligated rabbit ileal loops have been associated with enterotoxins
24 detected in the culture filtrates of the enterotoxigenic strains of *B. cereus* (Agata et al. 1995;
25 Beecher et al. 1995; Lund and Granum 1996) (Kotiranta et al. 2000). The enterotoxin
26 complex designated HBL (Heinrichs et al. 1993; Beecher et al. 1995; Beecher and Wong
27 1997; Ryan et al. 1997) is composed of a binding component B and two lytic components L1
28 and L2, and requires all three components for maximal activity. Another, three component
29 enterotoxin complex is denominated NHE, which is non hemolytic and has similarities with
30 the HBL enterotoxin complex (Lund and Granum 1996). Also single proteins responsible for
31 the enterotoxic effect of *B. cereus* strains have been reported (see Kotiranta et al. 2000 for a
32 review).

33 The emetic toxin causes a vomiting-type food poisoning syndrome in humans. The
34 emetic toxin produced by *B. cereus* has been named cereulide, and consists of a ring structure

1 of three repeats of four amino- and/or oxy-acids with a molecular mass of 1.2 kDa (Agata et
2 al. 1994). This toxin is resistant to heat, pH and proteolysis but is not antigenic (Kramer and
3 Gilbert 1989), it is responsible for the inhibition of hepatic mitochondrial fatty-acid oxidation
4 and to cause liver failure (Mahler et al. 1997).

5 Others virulence factors are produced by *B. cereus* strains and included three types of
6 phospholipases C, each with a different mechanism of action, and it is supposed to contribute
7 to tissue damage by inducing the degranulation of neutrophils (Wazny et al. 1990; Ding et al.
8 1995). Hemolysins are responsible for the hemolytic activity and have a role in infections
9 (Turnbull et al. 1979; Turnbull and Kramer 1983). Cereolysin or hemolysin I is a heat-labile,
10 thiol activated hemolysin and is inhibited by cholesterol (Cowell et al. 1976). Others
11 hemolysins include hemolysin II, which is not inhibited by cholesterol (Coolbaugh and
12 Williams 1978), hemolysin III (Baida and Kuzmin 1995), cereolysin AB (Gilmore et al. 1989)
13 and sphingomyelinase, a 34 kDa hemolytic protein that binds to sphingomyelin on
14 erythrocytes (Tomita et al. 1983; Granum and Nissen 1993).

15 Several studies have been conducted to evaluate toxin production in *B. cereus* and to
16 identify the presence of the genes responsible for their formation (Mäntynen and Lindström
17 1998; Hisieh et al. 1999; Prüß et al. 1999; Guttman and Ellar 2000; Hansen and Hendriksen
18 2001). These studies are necessary, given that not all strains of this bacterium have the genes
19 that code for toxins, and even in the strains that do possess those genes, their expression is not
20 always present, being modulated by a variety of factors such as the composition of the culture
21 medium (Rowan et al. 2001).

22 Although the most frequently analyzed toxins are HBL and NHE, other virulence
23 factors are also well studied, including phospholipases (phosphatidylinositol-specific
24 phospholipase C (PI-PLC), phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC),
25 sphingomyelinase), which have a poorly understood role in food intoxication. Other studies
26 have sought to detect a relationship between the production of these toxins and some other
27 specific characteristic, such as a random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker
28 (Ghelardi et al. 2002) or the source of the strain (*e.g.* soil samples, dairy products or
29 hospitalized patients). Unfortunately, no evidence for such relationship has been found to
30 date.

31 The genes that code for enterotoxins are not exclusive to species of the *B. cereus* group.
32 (Rowan et al. 2001) detected the presence of DNA sequences associated with genes that code
33 for the enterotoxins BceT and HBL in several species of the genus *Bacillus*, including strains
34 of *B. megabacterium*, *B. subtilis*, *B. circulans*, and *B. licheniformis* isolated from clinical

1 samples and from food. These authors also found that some of the analyzed strains were
2 capable of adhering to, invading and producing cytotoxic effects inside human epithelial cells
3 and that the expression of these genes is also dependent on the composition of the culture
4 medium.

5 Spores of *B. cereus* are ubiquitous, which makes it practically impossible to prevent
6 their presence, at least at low levels in foods, a fact that has indeed been demonstrated in
7 many studies aimed at detecting levels of microbial food contamination. Thus, the presence of
8 *B. cereus* in a given food item cannot be considered sufficient justification to accuse the food
9 or the bacterium as the causes of an outbreak. Therefore, it is imperative to quantify the
10 abundance of *B. cereus* on food, as well as to conduct bacteriological and serological tests to
11 ascertain the source of the responsible strain. The likely cause of cases of vomiting and
12 diarrhea can only be assigned to a given agent after the identifications of the presence of the
13 same strain at levels higher than 10^5 Colony-Forming Units (CFU) (Kramer et al. 1982)

14 Keeping in mind the fact that each event of food poisoning can be caused by a different
15 strain of *B. cereus*, which leads to variation in the type of enterotoxin and the amount of
16 vegetative cells and spores present in the food, there is currently a consensus with respect to
17 the dose necessary for a food item to be considered safe to human consumption. This dose
18 should not surpass 10^3 CFUs of *B. cereus* in a gram or milliliter of food (Granum 2002).

19 According to Heyndrickx and Schedelman (2002), food contamination by *B. cereus* is
20 easy to occur because its spores are virtually everywhere, causing them to be almost
21 impossible to be undetected in raw food and in ingredients. For this very reason,
22 contamination may occur after ineffective heat treatments or due to packaging problems. Heat
23 treatments such as pasteurization (at least 71.7 °C during 15 seconds) are efficient to kill
24 vegetative cells, but not spores. As a consequence, the absence of vegetative cells of other
25 microorganisms in the food enables spores that survived the heat treatment to grow with little
26 or no competition with other microorganisms. Spores of a variety of species display adhesive
27 characteristics, facilitating their fixation to the inner surface of plumbing and food processing
28 devices, followed by the formation of biofilms.

29 Considerable emphasis has been given to the capacity of strains of *B. cereus* to cause
30 food contamination, and many of the publications involving this bacterium are related to
31 methods for rapid detection of this species in food, as well as the identification of genes that
32 code for its toxins. However, this bacterium is also important as the model species of the *B.*
33 *cereus* group, being used for studies of gene expression (van Shaik et al. 2004), structural
34 organization and metabolism (Serevin et al. 2004), and even as the basis for probiotic

1 medications (Hansen and Salamitou 2000; Jadamus et al. 2002; Duc et al. 2004). The use of
2 this bacterium as a model has great relevance in the resolution of taxonomic issues that
3 involve in addition to *B. cereus*, other species of great importance, such as *B. anthracis* and *B.*
4 *thuringiensis*.

6 **3. *B. anthracis* AND ANTHRAX**

7
8 *B. anthracis*, the etiological agent of the disease known as anthrax, is a Gram-positive,
9 spore forming, rod shaped bacterium, with cells of 1-1,5 μm \times 4-10 μm in size, aerobic,
10 facultative anaerobic, non-motile, mesophile, with optimal growth temperatures around 37°C.
11 It is sensitive to penicillin, shows capsule production and no hemolytic activity in agar/blood
12 plates.

13 Anthrax is among the most ancient known diseases, being described since the biblical
14 times of Moses. Historically, it is of great importance for being the first bacterium to be
15 observed on a microscope by Pollender in 1849/1850, being isolated in pure culture by Robert
16 Kock in 1876. It was one of the organisms used for the development of the famous “Kock
17 postulates” defined in 1884, which still remains even today as a model for researchers in the
18 field of epidemiology. Moreover it was the first bacterium to be used for the preparation of a
19 vaccine based on attenuated bacteria by Louis Pasteur in 1881.

20 Even though anthrax affects primarily herbivores, virtually all mammals, including
21 humans, are susceptible to varying degrees. The disease is initiated by the invasion of spores
22 into the body of the host, which may occur through skin lesions, an insect bite, and the
23 ingestion of contaminated food or inhalation of contaminated air.

24 Spores formed by this bacterium are highly resistant to a variety of environmental
25 conditions such as heat, cold, UV and ionizing radiation, pressure and chemical agents.
26 Although they are often isolated from soil samples and may persist for long periods in the
27 environment, it is unclear if the complete life cycle, *i.e.* from germination to sporulation,
28 occurs outside the host (Mock and Fouet 2001). In herbivores, after being ingested, the spores
29 germinate inside the host, producing vegetative cells that multiply and produce virulence
30 factors, possibly leading to the death of the host.

31 This disease is rare in humans, occurring mostly in subjects that have contact with farm
32 animals or with contaminated animal products such as meat or feces. Three forms of the
33 disease can be distinguished depending on the route of infection: cutaneous, gastrointestinal

1 and inhalational (pulmonary). Each form may progress to fatal systemic anthrax. The
2 cutaneous form, which accounts for over 90% of all human cases (Spencer 2003), occurs
3 when spores infect through a lesion on the skin. Initial manifestations start as a small pimple
4 that develops, within a few days, into a painless black eschar, hence the name of the disease
5 (“anthrax” is derived from the Greek word for coal). This lesion is intense, usually circular,
6 characterized by edema and necrosis and in the corresponding lymph node. All of these
7 symptoms are very characteristic of the disease, which is easily diagnosed and may be treated
8 with a variety of antibiotics.

9 The gastrointestinal form occurs frequently after the ingestion of undercooked meat
10 from animals with *B. anthracis*. It is extremely rare, but can still be fatal. As in cutaneous
11 anthrax, the organisms probably invade the mucosa through a preexisting lesion. The bacteria
12 spread from the mucosal lesion to the lymphatic system. The disease is characterized by fever,
13 nausea, vomiting, abdominal pain and bloody diarrhea (Mock and Mignot 2003). The
14 inhalational form is considered the most dangerous among the three. Inhaled spores reach the
15 alveolus where they are phagocytosed by macrophages and then are transported to the
16 mediastinal lymph nodes, where spore germination might occur in up to 60 days (Guidi-
17 Rontani et al. 2000; Mock and Fouet 2001). Once germination has occurred, the disease
18 progresses rapidly with the production of exotoxins that causes edema, necrosis and
19 hemorrhage. Symptoms include fever, dyspnea, stridor, hypoxia and hypotension. Diagnosis
20 is difficult in both the gastrointestinal and the inhalational forms, and the disease develops
21 abruptly into a systemic form that is frequently fatal if not treated properly (Turnbull 1991).

22 There are two main virulence factors in *B. anthracis*: an antiphagocytic poly D-glutamic
23 acid capsule (Green et al. 1985; Fouet and Mesnage 2002) and the production of three
24 proteins, namely protective antigen (PA), lethal factor (LF) and edema factor (EF) (Moyaeri
25 and Leppla 2004). Individually, none of them is toxic; the toxicity is associated with the
26 formation of binary exotoxins through the association of PA and LF, called lethal toxin (LTx)
27 and of PA and EF, called edema toxin (ETx) (Collier and Young 2003). These toxins are
28 sufficient to produce most symptoms of anthrax. Moreover, isogenic strains lacking only the
29 gene coding for one of the three proteins (PA, LF or EF) are greatly attenuated (Pezard et al.
30 1991; Pezard et al. 1993; Mourez et al. 2002).

31 The genes *pagA*, *lef* and *cya*, which code for the proteins PA, LF and EF, respectively,
32 are located within a large plasmid called pXO1. This plasmid has been completely sequenced
33 in three strains (Okinaka et al. 1999a; Okinaka et al. 1999b; Read et al. 2002; Collier and
34 Young 2003). It has a conserved structure 181 kb in length, with a region called a

1 “pathogenicity island” that is 44.8 kb in length and is flanked by inverted IS elements. In
2 addition to the genes that code for the toxins, this region also contains regulatory elements
3 and 19 additional ORFs (Open Reading Frames).

4 Around 70% of the ORFs within pXO1 do not show significant similarity with other
5 sequences in databases. ORFs that show high levels of similarity with known sequences
6 include probable transposases, resolvases and integrases, indicating the lateral transfer of this
7 plasmid during the evolutionary process (Okinaka et al. 1999a; Okinaka et al. 1999b). Still in
8 this plasmid it is possible to find the germination operon *gerX*, responsible for trigger spore
9 germination within the macrophage. The proteins encoded by this operon (GerXA, GerXB,
10 and GerXC) are similar to *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. megaterium* germination proteins
11 (Corfe et al. 1994; Irie et al. 1996; Clements and Moir 1998). This operon is the first
12 germination operon known that is located on a virulence plasmid (Guidi-Rontani et al. 1999).

13 The pXO2 plasmid carries *capB*, *capC*, *capA*, *capD* and *dep*, all known to encode
14 capsule synthesis and degradation (Thorne 1993), and *acpA*, which is a regulatory gene that
15 together with another regulatory gene, *atxA*, influence the expression of virulence genes both
16 on the plasmid and on the chromosome (Bourgogne et al. 2003; Drysdale et al. 2004). This
17 plasmid was also completely sequenced in some strains (Okinaka et al. 1999b; Read et al.
18 2002) and showed 85 ORFs, including few genes with known function.

19 The fact that two plasmids contain the main virulence factors of *B. anthracis* allowed
20 the isolation of several attenuated strains through the loss of one or both plasmids. Many of
21 those attenuated strains were important for the development of vaccines ever since Louis
22 Pasteur. The cure of the pXO1 is rare and its spontaneous loss in samples from the
23 environment still has not been demonstrated. On the other hand, pXO2 is easily and
24 spontaneously lost (Turnbull et al. 1992). Strains bearing only pXO1 have been found in the
25 environment, and some of those still retained virulence. The only important phenotype
26 associated with pXO2 is encapsulation. Strains without this plasmid are frequently incapable
27 of establishing infection. This attenuated bacterium has been used as the basis for the
28 development of vaccines. However, nonencapsulated strains containing pXO2 are common,
29 suggesting that this plasmid is more susceptible to rearrangements than pXO1 (Welkos 1991;
30 Welkos et al. 1993).

31 In 2001, bioterrorist attacks using strains of *B. anthracis* caused great losses to the
32 North American economy. Considerable efforts were focused on the study of the toxin
33 produced by *B. anthracis*, leading to significant advances, particularly with respect to toxin
34 structure (Pannifer et al. 2001; Drum et al. 2002), the formation of binary toxins (Kumar et al.

1 2001; Chauhan and Bhatnagar 2002; Chopra et al. 2003; Tonello et al. 2003). Large portions
2 of these advances were obtained *in vitro*, allowing an understanding of the individual effects
3 of different factors. Future *in vivo* studies on model organisms should advance the
4 understanding of the pathogenicity and the host/bacterium relationship on this species.

6 **4. *B. thuringiensis*, CHARACTERISTICS AND BIOTECHNOLOGICAL USE**

7
8 *B. thuringiensis* is a Gram-positive, aerobic, facultative anaerobic, mesophile and
9 chemioheterotrophic, spore-forming bacterium. It has rod-shaped cells with 1.1 μm \times 4.0 μm
10 in size, being propelled in the medium through peritrichous flagella. During the sporulation or
11 in the stationary phase of its growth cycle, *B. thuringiensis* cells produce a parasporal crystal,
12 which is the only established characteristic that distinguishes *B. thuringiensis* from *B. cereus*.

13 The specific bioactivity of *B. thuringiensis* is due to the production of these crystals,
14 which are formed by polypeptides known as Cry proteins. These proteins show
15 entomopathogenic properties to insects from orders *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*,
16 *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Dictyoptera*, *Orthoptera*, *Mallophaga*, in addition to nematodes
17 (*Strongylida*, *Tylenchida*), protozoa (*Diplomonadida*) and mites (*Acari*) (Feitelson et al. 1992;
18 Schnepf et al. 1998; WHO, 1999).

19 The *cry* genes that code for Cry proteins are usually found in large transmissible
20 plasmids, or more rarely in the chromosome. The synthesis of Cry proteins and the formation
21 of the spore are simultaneous, but the regulation of the expression of these genes can be either
22 dependent or independent of sporulation (Agaisse and Lereclus 1995). Different combinations
23 of *cry* genes are found in various *B. thuringiensis* strains, including those with one, two or
24 even four different genes (Lereclus et al. 1993). The dispersion of these genes among strains
25 might be due to the presence of transposable elements associated with *cry* genes and to the
26 conjugation process. It is, therefore, possible to explain why the same toxin can be found in
27 isolates of *B. thuringiensis* with different serotypes. Several studies have shown that the
28 transfer of these genes by conjugation is very frequent in insects (Aly et al. 1985; Jarret and
29 Stephenson 1990; Vilas-Bôas et al. 1998; Thomas et al. 2000; Thomas et al. 2001), less
30 frequent in sterilized soil samples (Thomas et al. 2000; Thomas et al. 2001; Vilas-Bôas et al.
31 2000), and seems not to occur in unsterilized soil (Ferreira et al. 2003).

32 The *cry* gene sequences provided the basis for the construction of gene specific probes
33 to screen established Bt strains by hybridization and PCR based methodologies for the

1 presence of known nucleotide sequences, and for characterizing the Cry proteins from new Bt
2 isolates (Prefontaine et al. 1987; Juarez- Perez et al. 1997; Bravo et al. 1998). This fast way of
3 identification of *cry* genes has caused an increase in the number of know genes. To date, over
4 300 *cry* gene sequences have been determined and classified in 47 groups and different
5 subgroups with regard to their amino acid similarity
6 (http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html – accessed in
7 04/12/2005).

8 Cry proteins can range from 40 to 140 kDa and show a three-dimensional structure with
9 domains. Domain I is formed by a set of seven α -helices and is responsible for the formation
10 of lytic pores in the intestinal epithelium of the target insect. Domain II, formed by β -sheets
11 and loops, is involved in receptor binding. Domain III shows β -sandwich structure and could
12 play a number of key roles in the biochemistry of the toxin molecule (Li et al. 1991; Li et al.
13 1996; Grochulski et al. 1995).

14 The mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry proteins involves, primarily,
15 solubilization of the crystal in the insect midgut, through the break in the sulfide bonds among
16 the monomers of the Cry proteins, followed by the proteolytic processing of the protoxin by
17 midgut proteases, releasing the Cry toxin in its active form. The actived toxin binds to
18 specific receptors on the apical brush border of the midgut microvillae of susceptible insects.
19 The later steps involve insertion of toxin into apical membrane and a creation of ion channels
20 or pores that will result in the leakage of the intracellular contents, followed by the death of
21 the insect (Schnepf et al. 1998).

22 In addition to Cry proteins, some *B. thuringiensis* strains can be to produce others
23 insecticidal proteins. Beta-exotoxin is associated with certain *B. thuringiensis* subspecies
24 (*darmstadiensis*, *galleriae*, *tenebrionis* and *thuringiensis*). This heat-stable nucleotide, which
25 is composed of adenine, glucose and allaric acid, inhibits RNA polymerase enzymes by acting
26 competitively with ATP (Johnson 1976). Since RNA synthesis is a vital process in all life,
27 beta-exotoxin exerts its toxicity for almost all forms of life tested. Thus, products based on *B.*
28 *thuringiensis* containing beta-exotoxin are used for the control of houseflies (*Musca*
29 *domestica*) in some countries, but regulatory agencies currently prohibit the use of beta-
30 exotoxin for other purposes (WHO 1999).

31 A novel vegetative insecticidal protein (Vip) has been identified from the culture media
32 of some *B. thuringiensis* strains (Estruch et al. 1996). As a family, Vip proteins do not show
33 any similarity to Cry proteins. The first *vip* genes described were *vip3Aa1* and *vip3Aa2*. Vip

1 proteins possess toxicity of the same magnitude as that of Cry proteins against the susceptible
2 insects. The insecticidal spectrum of Vip proteins includes coleopteran specificity (Vip1 and
3 Vip2) and lepidopteran specificity (Vip3) insect pests, which have shown insensitivity to the
4 *B. thuringiensis* Cry proteins (Estruch et al. 1996; Chen et al. 2003; Shi et al. 2004).

5 Toxicity studies submitted to the US Environmental Protection Agency to support
6 registration of *B. thuringiensis* subspecies, are reviewed by McClintock et al. (1995). The
7 tests include effects on mammals with oral, inhalation and dermal exposure, dermal
8 scarification exposure, ocular and intraperitoneal exposure, subcutaneous inoculation, and
9 tests with immune-intact animals and immune-suppressed animals. Effects on birds, on aquatic
10 vertebrates, on invertebrates including non-insects and non-target insects, aquatic insects,
11 terrestrial insects, honey-bees and on parasitoids (WHO 1999). These toxicity tests have
12 failed to show any significant adverse effects in body weight gain, clinical observations, or
13 upon necropsy. The results also indicate that the currently used protocols for
14 toxicity/pathogenicity evaluations of microorganisms in laboratory animals have provided
15 useful and necessary information for risk assessment (McClintock et al. 1995).

16 Because of its extremely specific mode of action and remarkable safety, the use of *B.*
17 *thuringiensis* products on agricultural and forest crops dates back nearly 30 years, when it
18 became available in France. Conventional Bt products, which utilize naturally-occurring *B.*
19 *thuringiensis* strains, account for approximately 90% of the world MPCA (microbial pest
20 control agents) market. These products have been targeted against lepidopteran and
21 coleopteran pests and used on major crops such as cotton, maize, soybeans, potatoes,
22 tomatoes, stored grains and on forest crops. These last one utilization is very important
23 because of the great variety of found insects in those areas, what demands the use of very
24 specific insecticides to prevent collateral impacts on other (including beneficial) insects.

25 In addition to an increasing use in agriculture, since 1977, the discovery of *B.*
26 *thuringiensis* subsp. *israelensis* resulted in large-scale programs for the control of mosquitoes
27 (*Culex* spp) and blackflies (*Simullium* spp) (Becker and Margalit 1993). For example, in
28 Germany *B. thuringiensis israelensis* products were used to control mosquitos (*Anopheles* and
29 *Culex* species) (Becker and Margalit 1993), in China for the control of malaria vector
30 (*Anopheles sinensis*) and in The Onchocerciasis Control Programme of West Africa, was used
31 more than five million litres of Bti from 1982 to 1997 to control blackflies (*Simulium*
32 *damnosum*), the vector of the onchocerciasis filarial worm (*Onchocerca volvulus*), on the
33 Upper Volta River System (WHO 1999).

1 *B. thuringiensis* strains can be found in most ecological niches, such as soil samples
2 (Vilas-Bôas and Lemos 2004; Bernhardt et al. 1997; Martin and Travers, 1989), in the
3 phylloplane of different plants (Hansen et al. 1998; Smith and Couche, 1991), in insects and
4 their habitats (Chilcott and Wigley, 1993; Itoua-Apoloyo et al. 1995), and in stored grains
5 (Meadows et al. 1992). Thus, *B. thuringiensis* products may be applied to several ecosystems
6 to achieve insect control, such as foliage, soil, water environments and in stored grains. After
7 application of *B. thuringiensis* to an ecosystem, the organism may persist as a component of
8 the natural microflora. The survival and activity of the *B. thuringiensis* strains in the
9 environment has been reviewed by Hansen et al. (1996).

10 An alternative to the use of products based on *B. thuringiensis* toxins is the possibility
11 of heterologous expression of *cry* genes in other bacteria. These modified organisms have
12 been developed in order to increase host range, prolong field activity or improve delivery of
13 toxins to target organisms. For example, *Escherichia coli*, *Bacillus sphaericus*, *B. subtilis*, *B.*
14 *megaterium* and *Pseudomonas fluorescences* and the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120.
15 The multiplication of recombinant strains of *P. fluorescences* was used to produce a
16 bioinsecticide in which protein crystals remain encapsulated in dead cells. The rationale of
17 this method is the observation that encapsulated Cry proteins show improved persistence in
18 the environment (Sanchis 2000; Federici et al. 2003; Manasherob et al. 2003; Peng et al.
19 2003; Tanapongpipat et al. 2003; Kumar and Udayasuriyan 2004).

20 Endophytic and epiphytic bacteria have also been used as vectors, allowing the
21 prolongation of the persistence of crystals in the field by its capacity of propagation in the
22 feeding sites of the target insects and its continual production of these crystals. An example of
23 this system is the introduction of the gene *cry1Ac* in *Clavibacter xyli*, an endophytic
24 bacterium, resulting in a recombinant strain that was inoculated in maize for the control of
25 caterpillars (Tomasino et al. 1995). Likewise, this system has been used in other plant
26 colonizers such as *Azospirillum* spp, *Rhizobium leguminosarum* and *Pseudomonas* spp
27 (Obukowicz et al. 1986; Sanchis 2000; Gounder and Rajendran 2001).

28 In addition to being introduced in microorganisms, several *cry* genes have also been
29 introduced in plants, starting with tobacco and presently being found in a variety of cultivated
30 species, including alfalfa, cotton, rice, apple, maize, pear, broccoli, soy beans, and sugar cane
31 (Shelton et al. 2002; Gould 1998).

32 The production of Cry proteins in plants can offer several benefits and are
33 revolutionizing agriculture in the world. In several plants the Cry toxins are produced
34 continuously and persist in the plant tissue (Sims and Holden 1996), resulting in a smaller

1 number of applications of other insecticides and reducing field management costs. In some
2 plants the Cry proteins can be expressed only when and where needed, through the use of
3 tissue-specific, temporal specific, or inducible gene promoters (Shelton et al. 2002). Thus, the
4 so-called Bt plants are advantageous for being less deleterious to the environment than
5 chemical insecticides. The main disadvantages of the Bt-plants are the potential insect
6 resistance development to Cry toxins and the gene flow to wild relatives. However, several
7 strategies are proposed for delaying the development of resistance and to hinder the gene flow
8 to others relatives (Gould 1998; Wisniewski et al. 2002; Bourguet 2004).

9 In conclusion, the extensive knowledge on the mode of action of Cry proteins produced
10 by *B. thuringiensis*, their high specificity, as well as the new technologies are some of the
11 factors that allowed the development of a wide array of bioinsecticides based on this
12 bacterium for more than 30 years. However, the uncertainty regarding their taxonomic
13 position within the *B. cereus* group is a current issue, which should be investigated to
14 corroborate the safety of using products based on *B. thuringiensis*.

15

16 **5. TAXONOMY OF THE *B. cereus* GROUP**

17

18 The term “*Bacillus cereus* group” is a nontaxonomic term that has been commonly used
19 to refer to a group of bacteria whose taxonomy has been widely discussed. This group is
20 traditionally composed of four species: *B. cereus*, considered the model species of the group,
21 *B. thuringiensis*, *B. anthracis* and *B. mycooides*. More recently, two additional species were
22 also included, *B. pseudomycooides* (Nakamura 1998) and *B. weihenstephanensis* (Lechner et
23 al. 1998).

24 Extensive genomic studies conducted on strains of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *B.*
25 *anthracis* using different techniques such as multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE)
26 (Helgason et al. 1998), sequencing of discrete protein-coding genes (Helgason et al. 2000b),
27 amplified fragment length polymorphisms (AFLP) fingerprinting technique (Ticknor et al.
28 2001; Hill et al. 2004), and the multi-locus sequence typing (MLST) technique (Helgason et
29 al. 2004), have suggested that *B. thuringiensis* and *B. anthracis* should be classified as
30 subspecies of the species *B. cereus*. These studies are based on the fact that the distinction
31 between these species is primarily due to phenotypic characters whose genes are located on
32 plasmids, such as the production of the Cry protein by cells of *B. thuringiensis* and the
33 production of toxins and capsule by cells of *B. anthracis*.

1 The nucleotide sequence of 16S rDNA and 23S rDNA of these three species show very
2 high levels of sequence similarity (Ash et al. 1991b; Ash and Collins 1992; Manzano et al.
3 2003), indicating a recent divergence from a single evolutionary line relatively recently
4 (Granum 2002). Therefore, the analysis of sequences of these genes might be used only to
5 characterize a given strain as belonging to the *B. cereus* group, without being able to identify
6 the species. Thus, new appropriate molecular taxonomic markers based on other genes are
7 necessary. Yamamoto and Harayama (1995) suggested that genes that are not spread
8 horizontally among different bacterial species should be used to trace the evolutionary record
9 of host bacteria. Based on information that the average rate of substitution for the 16S rDNA
10 gene is 1% per 50 million years and that the rate for synonymous sites of protein-coding DNA
11 is 0.7 to 0.8% per million years, these authors suggested the *gyrB* gene as a substitute for 16S
12 rDNA gene as a molecular taxonomic marker for bacterial species. The *gyrB* gene is essential
13 for DNA replication, coding for the β -subunit (the ATPase domain) of a DNA gyrase (type II
14 topoisomerase), regulating the super-coiling of the DNA molecule, it is also single copied and
15 has conserved regions for the development of PCR primers.

16 Using the *gyrB* gene, Yamada et al. (1999) amplified, cloned, sequenced and developed
17 a set of primers to identify strains of *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis* without
18 analysing their phenotypes, serotypes, and virulence factors. Manzano et al. (2003) detected
19 the presence of strains of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in samples from
20 different sources. Later, this gene was used together with DNA:DNA hybridization technique
21 to obtain the discrimination of the four species that traditionally composed the *B. cereus*
22 group (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* and *B. mycoides*) (La Duc et al. 2004).
23 However, due to the high level of lateral gene transfer within this group of bacteria (Vilas-
24 Bôas et al. 2002; Read et al. 2003), these analyses do not discriminate well the avirulent
25 strains of *B. anthracis* and *B. thuringiensis* from those of *B. cereus*.

26 In addition to the *gyrB* gene, other genes have been recently used in the study of the
27 phylogenetic relationships in this group of bacteria. Chang et al. (2003) obtained phylogenetic
28 trees based on nucleotide sequences of the genes *groEL* and *sodA*, which encode highly
29 conserved housekeeping proteins that assist in proper protein folding (molecular chaperonins)
30 and a manganese-dependent enzyme (manganese-dependent superoxide dismutase),
31 respectively. These genes have been used for the identification of species and their taxonomic
32 classification in the genus *Staphylococcus* (Goh et al. 1997) and several species of
33 *Streptococcus* (Poyart et al. 1998) and *Enterococcus* (Poyart et al. 2000).

1 The phylogenetic tree constructed from the *sodA* sequences showed substantial
2 similarity to the tree constructed from the *groEL* sequences, placing each species into
3 different clusters, with strains of *B. anthracis* being more closely related to some strains of *B.*
4 *cereus*. Oligonucleotide probes were obtained for the identification of *B. anthracis* strains,
5 which is a very homogeneous species and whose apparent relatedness to *B. cereus* and *B.*
6 *thuringiensis* is highly dependent on the strains studied.

7 Although there is still no consensus in the literature, some papers already demonstrated
8 discrimination between *B. anthracis* in relation to *B. cereus* and *B. thuringiensis* (Harrel et al.
9 1995; Keim et al. 1997; Chang et al. 2003; Radnedge et al. 2003). These results are due to the
10 low genetic variability that is characteristic of this species, in contrast to the high genetic
11 variability of *B. cereus* and *B. thuringiensis*. This low genetic variability is probably a result
12 of its life cycle within the host, where the vegetative growth phase has an explosive nature.
13 Due to its speed, the number of genetic recombinations decrease or even cease between
14 strains of *B. anthracis* or with other species (Schupp et al. 2000).

15 The genetic polymorphism showed by *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains and the
16 extensive similarity in their genetic sets are the main complicating factors for the resolution of
17 the taxonomic issue between these two species. One of the first studies aimed at investigating
18 their taxonomic relationships was conducted by Carlson et al. (1994) using pulse-field gel
19 electrophoresis (PFGE) and MLEE. A high degree of genetic variability was observed within
20 and between the two species. Because neither PFGE nor MLEE grouped the strains by
21 recognized species designations, it was suggested that *B. cereus* and *B. thuringiensis* should
22 be considered as a single species.

23 Another studies using MLEE and sequence analysis of chromosomal genes showed high
24 degree of genetic similarity and indicated a lack of differentiation between *B. thuringiensis*
25 and *B. cereus* (Helgason et al. 1998; Helgason et al. 2000a; Helgason et al. 2000b). Ticknor et
26 al. (2001), based on results from AFLP, MLEE and 16S rDNA sequence data showed that *B.*
27 *cereus* and *B. thuringiensis* are highly polymorphic and that a simple analysis of a limited
28 number of strains is not sufficient to characterize these species.

29 In 2002, a study by Vilas-Bôas et al. using MLEE and hemolytic activity analyzed
30 sympatric populations of *B. cereus* and *B. thuringiensis*, *i.e.* populations obtained from the
31 same site at the same time, found that populations of a given *Bacillus* species - *B.*
32 *thuringiensis* or *B. cereus* - from different soil samples were more similar genetically to each
33 other than populations of other *Bacillus* species from the same soil sample. The results

1 suggested also that the rate of gene flow was higher between strains of the same species, but
2 that exchanges between *B. cereus* and *B. thuringiensis* were nonetheless possible.

3 Genetic differentiation between *B. thuringiensis* and *B. cereus* was also obtained by
4 Cherif et al. (2003) by rep-PCR fingerprinting using the BOX-A1R primer, using a collection
5 of strains of the six species of the *B. cereus* group. Clusters of *B. cereus* strains were very
6 distinct from those of *B. thuringiensis*. In addition, the relationships between the other species
7 in the group were inferred, indicating that species were clearly separated and all six species in
8 the group should be regarded as distinct units.

9 Helgason et al. (2004) used MLST to analyze 77 strains of the *B. cereus* group, of
10 which 67 had already been analyzed previously by MLEE. Primers were designed for
11 conserved regions of seven housekeeping genes. Analysis of sequence data demonstrated that
12 the MLST results are in agreement with results obtained previously by MLEE, *i. e.* that *B.*
13 *cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis* should be regarded as one species.

14 Others studies based on MLST method include Priest et al. 2004; Ko et al., 2004;
15 Bavykin et al. 2004. Studies based on sequence analysis have several advantages, including
16 improved precision, portability, and reproducibility (Maiden et al. 1998; Spratt 1999).
17 Furthermore, the data can be analyzed by a variety of phylogenetic and population genetic
18 approaches to establish the nature of the variation under examination and to investigate
19 possible evolutionary models for how this variation has arisen (Priest et al. 2004).

20 In 2002, the sequence of the genome of the *B. anthracis* A2012 strain was published
21 (Read et al. 2002). Since then, sequences from a variety of strains of the *B. cereus* group were
22 made available in databases, including three strains of *B. anthracis* (A2012, Ames, Sterne),
23 three of *B. cereus* (ATCC 14579, ATCC 10987, ZK) and one of *B. thuringiensis* (serovar
24 *konkukian* strain 97-27). In addition to the genomes already available, eight other genome
25 projects are currently under way with respect to *B. anthracis* strains A1005, Australia 94,
26 CNEVA-9066, Kruger B, Vollum and Western North America USA 6153, in addition to the
27 G9241 strain of *B. cereus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. A current status of the
28 genome sequencing projects completed and in progress is reviewed in Rasko et al. 2005.

29 The genome sequencing and the post-genomic technologies such as microarray analysis
30 and proteomic profiling allow studying bacterial species at levels of detail never previously
31 attained. For instance, Ivanova et al. (2003) had made comparative analyses between the
32 genomes of two strains and found that *B. cereus* ATCC 14579 has 5,366 coding sequences
33 (CDSs), of which 4,505 have 80-100% identity to their homologues in *B. anthracis* A2012.
34 Potential orthologues represent approximately 75% of the CDSs for each of the genomes, and

1 85% of these potential orthologues have conserved neighborhoods. The large core set of
2 genes (75%-80%) conserved between *B. cereus* ATCC 14579 and *B. anthracis* A2012 could
3 have been inherited from a common ancestor.

4 The publication of sequences of the complete genome of *B. cereus* ATCC 14579 and *B.*
5 *anthracis* Ames (Read et al. 2003; Ivanova et al. 2003) also emphasized the importance of the
6 pleiotropic regulator PlcR described by Lereclus et al. (1996) and Agaisse et al. (1999). This
7 regulon is considered as one of the principal regulators of *B. cereus* virulence genes. More
8 than 100 genes putatively belong to the PlcR regulon on the basis of the presence of a PlcR
9 DNA-binding sequence upstream from these genes.

10 Among the genes regulated by PlcR that are potentially involved in virulence, there are
11 phospholipases (phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC),
12 phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC), sphingomyelinase), cholesterol-
13 dependent hemolysins (cereolysin Clo in *B. cereus* and thuringiolysin Tlo in *B. thuringiensis*),
14 proteases (ColB, InhA, Sfp, NprB, NprP2) a cytotoxin (CytK), a hemolytic (HBL) and
15 nonhemolytic (Nhe) enterotoxins (Agaisse et al. 1999; Gohar et al. 2002; Brillard and
16 Lereclus 2004).

17 Although many of those genes are also found in *B. anthracis*, this bacterium does not
18 express them. Strains of *B. anthracis* are non motile, sensible to β -lactam antibiotics and non
19 hemolytic on sheep blood agar plates, whereas most strains of *B. cereus* and *B. thuringiensis*
20 are hemolytic, motile, and resistant to this group of antibiotics. These characteristics are
21 regulated by PlcR and are commonly used to distinguish *B. anthracis* from *B. cereus* and *B.*
22 *thuringiensis* (Table 2). Thus, some of the largest differences used to distinguish *B. anthracis*
23 from the other two species do not result from gene presence or absence, but rather from the
24 occurrence of changes in the expression of the *plcR* gene in strains of *B. anthracis* (Mignot et
25 al. 2001).

26 In a study conducted in 2004, Slamti and colleagues, working on *B. anthracis* strains
27 and on non-hemolytic strains of *B. cereus* and *B. thuringiensis*, verified that all strains of *B.*
28 *anthracis* contained the same nonsense mutation in the *plcR* gene, coding for an inactive PlcR
29 protein. On the other hand, among the strains of *B. cereus* and *B. thuringiensis* tested,
30 different mutations were detected in the same gene without correspondence with the mutation
31 conserved in *B. anthracis*. Based on these results, it was possible to suggest that the mutation
32 in the gene typical of strains of *B. anthracis* can be used as a distinctive trait of this species.

33 Ko et al. 2004, investigated the population structure of the *B. cereus* group by
34 sequencing seven gene fragments, including the *plcR* gene, which showed characteristics that

1 differed from those of the other genes in terms of phylogenetic topology and pattern of
2 sequence diversity. The authors suggested that the evolutionary history of the PlcR regulon
3 differs from those of the other chromosomal genes and that recombination of the *plcR* gene
4 may be frequent.

5 Ivanova et al. (2003) and Read et al. (2003) also analyzed the metabolic potential of the
6 genic sets of strains of *B. cereus* and *B. anthracis* that had their genomes sequenced, finding
7 evidence against the hypothesis of a soil bacterium as the common ancestor of these species.
8 According to these authors, soil bacteria are characterized a multiplicity of carbohydrate
9 catabolic pathways because plant-derived material are their main source of nutrients. For
10 instance, *B. subtilis* have 41 genes for the degradation of carbohydrate polymers (Kunst et al.
11 1997). On the other hand, *B. cereus* and *B. anthracis* were found to possess only 14 and 15
12 CDSs for polysaccharide degradation enzymes, respectively. Furthermore, the functions of
13 these genes are limited to degradation of glycogen, starch, chitin and chitosan, all of which
14 are important components of insect tissues. Both species contain many protease genes - 51
15 and 48, respectively - and many peptide and amino acid transporter transporter genes. These
16 observations indicate that the normal food source of both species is degraded animal tissue
17 and that the natural habitat for the common ancestor of the *B. cereus* group might have been
18 the insect intestine.

19 The whole-genome sequences of *B. cereus* ATCC10987 (Rasko et al. 2004) revealed
20 that this strain is more similar genetically to *B. anthracis* Ames than to the other strain of *B.*
21 *cereus* that had already been sequenced (ATCC 14579). Although this observation is not
22 surprising, it confirms the *B. cereus* group as an intermingled genetic cluster partially
23 characteristic, but also sharing some common identity of other clusters as a consequence of
24 horizontal gene transfer.

25 The availability of whole-genome sequences of several strains of the *B. cereus* group,
26 combined with functional genomic studies including microarrays and proteomics tools will
27 supply the understanding of the dynamics of genome evolution in these species and therefore,
28 to obtain substantial advances in the classification in this group of bacteria.

30 6. CONCLUSION

31
32 Genomic analyses have recently shown that a fraction of bacterial species genomes
33 (frequently 5% – 15%) originates from other species due to the transfer of homologous or

1 heterologous segments including transposable elements, plasmids or phages (Majewski and
2 Cohan 1999; Ochman et al. 2000). This observation emphasizes the importance of genetic
3 exchange in bacteria, leading to profound differences between them and other the highly
4 sexual eukaryotes (animal and plants), which are usually the basis of current species concepts.
5 Although eukaryotes are genetical closed systems, bacteria are open to gene transfer from
6 without, including distantly related species. Therefore, plants and animals must evolve
7 exclusively from their own genetic material, each bacterial species can take up existing
8 adaptations from a great diversity of other species (Cohan 2002).

9 Hence, speciation in bacteria essentially requires ecological divergence, whereas in
10 highly sexual eukaryotes it requires both reproductive and ecological divergence (Cohan
11 1994). Therefore, in bacterial systematic, a species must be considered more than a cluster of
12 closely related organisms that display similar dynamic properties. The Ecological Species
13 Concept, described by van Valen, (van Valen 1976), is particularly useful in this context. It
14 suggests that different species occupy different ecological niches, either by using different
15 resources, or by using the same resources at different times, or by occupying different
16 microhabitats (niche is the variety of factors in an environment that limit the growth of one
17 type relative to others).

18 According to the niche exclusion principle (Hardin 1960), a niche might only support
19 one type of organism, regardless of whether it is a genotype or a species. Therefore, it is
20 necessary to investigate if the characteristics of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *B. anthracis*
21 enable them to occupy different ecological niches in the environment. In addition to the
22 studies on genetic diversity, special attention should be devoted to their ecology, population
23 genetics, and to the evolutionary aspects that drive the origin and destiny of the genetic
24 diversity in these species.

25 In this context, one has to keep in mind that the structure of the environment is
26 intimately connected with the origin and maintenance of genetic variability. Therefore, the
27 experimental design of future ecological studies must consider the fitness of the studied
28 genotypes, *i.e.* the measure of the ability of a given genotype to reproduce in relation to other
29 genotypes, always taking into account the interaction among genotypes and between
30 genotypes and the environment.

31

32

33

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Didier Lereclus for many discussions and for reading of the manuscript and helpful comments. This review was supported by grants from CAPES, CNPq and Universidade Estadual de Londrina. G.T.V.-B. was supported by a fellowship from CNPq.

8. REFERENCES

- Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O.A., Kolstø, A.-B. and Lereclus, D. (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **32**, 1043-1053.
- Agaisse, H. and Lereclus, D. (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol* **177**, 6027-6032.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M. (1994) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett* **121**, 31-34.
- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y. and Mori, M. (1995) The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology* **141**, 983-988.
- Aly, C., Mulla, M.S. and Federici, B.A. (1985) Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae. *J Invert Pathol* **46**, 251-258.
- Ash, C. and Collins, M.D. (1992) Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* **73**, 75-80.
- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. and Collins, M.D. (1991a) Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 343-346.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D. (1991b) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* **13**, 202-206.
- Baida, G.E. and Kuzmin, N.P. (1995) Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta* **1264**, 151-154.
- Bavykin, S.G., Lysov, Y.P., Zakhariev, V., Kelly, J.J., Jackman, J., Stahl, D.A. and Cherni, A. (2004) Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Microbiol* **42**, 3711-3730.

- 1 Becker, N. and Margalit, J. (1993) Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against
2 mosquitoes and blackflies. In *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory*
3 *and practice* ed. Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J. and Higgs, S. pp.147-170.
4 Chichester, New York, Toronto, Wiley & Sons.
5
- 6 Beecher, D.J., Schoeni, J.L. and Wong, A.C.L. (1995) Enterotoxic activity of hemolysin BL
7 from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* **63**, 4423-4428.
8
- 9 Beecher, D.J. and Wong, A.C.L. (1997) Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*.
10 Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone
11 phenomenon. *J Biol Chem* **272**, 233-239.
12
- 13 Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers,
14 P., and Burges, H.D. (1997) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution,
15 characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* **70**, 59-68.
16
- 17 Bourgogne, A., Drysdale, M., Hilsenbeck, S.G., Peterson, S.N. and Koehler, T.M. (2003)
18 Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence
19 plasmids. *Infect Immun* **71**, 2736-2743.
20
- 21 Bourguet, D. (2004) Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer:
22 what chance for Bt maize? *Physiol Entomol* **29**, 251-256.
23
- 24 Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L.,
25 Villalobos, F.J., Pena, G., Nunez-Valdez, M.E., Soberon, M. and Quintero, R. (1998)
26 Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl*
27 *Environ Microbiol* **64**, 4965-4972.
28
- 29 Brillard, J. and Lereclus, D. (2004) Comparison of cytotoxin *cytK* promoters from *Bacillus*
30 *cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain. *Microbiology-SGM*
31 **150**, 2699-2705.
32
- 33 Callegan, M.C., Kane, S.T., Cochran, D.C. and Gilmore, M.S. (2002) Molecular mechanisms
34 of *Bacillus endophthalmitis* pathogenesis. *DNA Cell Biol* **21**, 367-373.
35
- 36 Carlson, C.R., Caugant, D.A. and Kolstø, A.-B. (1994) Genotypic diversity among *Bacillus*
37 *cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1719-1725.
38
- 39 Chang, Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.C. and Liu, H.W. (2003) PCR assay of the *groEL* gene
40 for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl Environ Microbiol* **69**,
41 4502-4510.
42
- 43 Chauhan, V. and Bhatnagar, R. (2002) Identification of aminoacid residues of anthrax
44 protective antigen involved in binding with lethal factor. *Infect Immun* **70**, 4477-4484.
45
- 46 Chen, J., Yu, J., Tang, L., Tang, M., Shi, Y. and Pang, Y. (2003) Comparison of the
47 expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated *vip3A* gene in
48 *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **95**, 310-316.
49

- 1 Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H. and
2 Daffonchio, D. (2003) Genetic Relationship in the ‘*Bacillus cereus* group’ by rep-PCR
3 fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J Appl*
4 *Microbiol* **94**, 1108-1119.
5
- 6 Chilcott, C.N. and Wigley, P.J. (1993) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from
7 soil and insect habitats in New Zealand. *J Invertebr Pathol* **61**, 244-247.
8
- 9 Chopra. A.P., Boone, S.A., Liang, X. and Duesbery, N.S. (2003) Anthrax lethal factor
10 proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J Biol Chem* **278**, 9402-9406.
11
- 12 Clements, M.O. and Moir, A. (1998) Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the
13 response of spores to germinants. *J Bacteriol* **180**, 6729-6735.
14
- 15 Cohan, F.M. (1994) The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary
16 divergence in prokaryotes. *Am Nat* **143**, 965-986.
17
- 18 Cohan, F.M. (2002) What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* **56**, 457-487.
19
- 20 Collier, R.J. and Young, J.A.T. (2003) Anthrax Toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 45-70.
21
- 22 Coolbaugh, J.C. and Williams, R.P. (1978) Production and characterization of two
23 hemolysins of *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol* **24**, 1289-1295.
24
- 25 Corfe, B.M., Sammons, R.L., Smith, D.A. and Mauël, C. (1994) The *gerB* region of the
26 *Bacillus subtilis* 168 chromosome encodes a homologue of the *gerA* spore germination
27 operon. *Microbiology* **140**, 471-478.
28
- 29 Cowell, J.L., Grushoff-Kosyck, P.S. and Bernheimer, A.W. (1976) Purification of cereolysin
30 and the electrophoretic separation of the active (reduced) and inactive (oxidized) forms of the
31 purified toxin. *Infect Immun* **14**, 144-154.
32
- 33 Daffonchio, D., Cherif, A. and Borin, S. (2000) Homoduplex and heteroduplex
34 polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe
35 genetic relationships in the “*Bacillus cereus* group”. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5460-5468.
36
- 37 Ding, Y., Uitto, V.J., Firth, J., Salo, T., Haapasalo, M., Konttinen, Y.T. and Sorsa, T. (1995)
38 Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human
39 periodontal diseases. *Oral Dis* **1**, 279-286.
40
- 41 Drum, C.L., Yan, S.-Z., Bard, J., Shen, Y.-Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A.
42 and Tang, W.-J. (2002) Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase
43 exotoxin by calmodulin. *Nature* **415**, 396-402.
44
- 45 Drysdale, M., Bourgoigne, A., Hilsenbeck, S.G. and Koehler, T.M. (2004) *atxA* controls
46 *Bacillus anthracis* capsule synthesis via *acpA* and a newly discovered regulator, *acpB*. *J*
47 *Bacteriol* **186**, 307-315.
48

- 1 Duc, L.H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Henriques, A.O. and Cutting, S.M. (2004)
2 Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* **70**,
3 2161–2171.
4
- 5 Estruch, J.J., Warren, G.W., Mulis, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. and Koziel, M.G. (1996)
6 Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of
7 activities against lepidopteran insects, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5389–5394.
8
- 9 Federici, B.A., Park, H.W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C. and Johnson, J.J. (2003) Recombinant
10 bacteria for mosquito control. *J Exp Biol* **206**, 3877-3885.
11
- 12 Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond.
13 *Bio/Technology* **10**, 271-275.
14
- 15 Ferreira, L.H.P.L., Suzuki, M.T., Itano, E.M., Ono, M.A. and Arantes, O.M.N. (2003)
16 Ecological aspects of *Bacillus thuringiensis* in an oxisoil. *Sci Agric* **60**, 19-20.
17
- 18 Fouet, A. and Mesnage, S. (2002) *Bacillus anthracis* cell envelope components. *Curr Top*
19 *Microbiol Immunol* **271**, 87-113.
20
- 21 Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A. and Senesi, S. (2002)
22 Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two
23 food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol Lett* **208**, 129-134.
24
- 25 Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J. and Goebel, W. (1989) A
26 *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C
27 and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *J Bacteriol* **171**, 744–
28 753.
29
- 30 Ginsburg, A.S., Salazar, L.G., True, L.D. and Disis, M.L. (2003) Fatal *Bacillus cereus* sepsis
31 following resolving netropenic enterocolitis during treatment of acute leukemia. *Am J*
32 *Hematol* **72**, 204-208.
33
- 34 Goh SH, Santucci Z, Kloos WE, Faltyn M, George CG, Driedger D and Hemmingsen SM
35 (1997) Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene
36 identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol* **35**: 3116-
37 3121.
38
- 39 Gohar, M., Økstad, O.A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolstø, A.-B. and Lereclus, D. (2002) Two-
40 dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals
41 the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**, 784-791.
42
- 43 Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics
44 and ecology. *Annu Rev Entomol* **43**, 701-726.
45
- 46 Gounder, R. and Rajendran, N. (2001) Transformation studies of *Bacillus thuringiensis cryIC*
47 gene into a nitrogen-fixing *Azospirillum lipoferum*. *Z. Naturforsch. [C]* **56**, 245-248.
48

- 1 Granum, P.E. (2002) *Bacillus cereus* and Food Poisoning. In: *Applications and systematics of*
2 *Bacillus and relatives* ed. Berkeley, R., Heyndrickx, M.N. and de Vos, P. 1st ed., pp.37-46.
3 Oxford: Blackwell Science Ltda.
4
- 5 Granum, P.E. and Baird-Parker, T.C. (2000) *Bacillus* spp. In *The Microbiological Safety and*
6 *Quality of Food* ed. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. pp.1029-1039.
7 Maryland: Aspen Publishers.
8
- 9 Granum, P.E. and Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS*
10 *Microbiol Lett* **157**, 223-228.
11
- 12 Granum, P.E. and Nissen H. (1993) Sphingomyelinase is part of the 'enterotoxin complex'
13 produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **110**, 97-100.
14
- 15 Green, B.D., Battisti, L., Koehler, T.M., Thorne, C.B. and Ivins, B.E. (1985) Demonstration
16 of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **49**, 291-297.
17
- 18 Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R.
19 and Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and
20 channel formation. *J Mol Biol* **254**, 447-464.
21
- 22 Guidi-Rontani, C., Pereira, Y., Ruffie, S., Sirard, J.C., Weber-Levy, M. and Mock, M. (1999)
23 Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXOI of
24 *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **33**, 407-414.
25
- 26 Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Mock, M. and Cabiaux, V. (2000) Translocation of
27 *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. *Cell Microbiol* **2**,
28 259-264.
29
- 30 Guttman, D.M. and Ellar, D.J. (2000) Phenotypic and genotypic comparison of 23 strains
31 from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *Bacillus thuringiensis*
32 virulence factors. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 7-13.
33
- 34 Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. and Pedersen, J.C. (1996) *Bacillus*
35 *thuringiensis*, ecology and environmental effects of its use for microbial pest control
36 (*Environmental Project No. 316*). Copenhagen, Denmark, Ministry of Environment and
37 Energy, Danish Environmental Protection Agency.
38
- 39 Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J., and Pedersen, J.C. (1998) Molecular and
40 phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J*
41 *Invertebr Pathol* **71**, 106-114.
42
- 43 Hansen, B.M. and Hendriksen, N.B. (2001) Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and
44 *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol* **67**, 185-189.
45
- 46 Hansen, B.M. and Salamiou, S. (2000) Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In:
47 *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* ed. Charles, J.F.,
48 Delécluse, A. and Nielsen-Le Roux, C. 1st ed., pp.41-54. Dordrecht: Kluwer Academic
49 Publishers.
50

- 1 Hardin, G. (1960) The competitive exclusion principle. *Science* **131**, 1292-1297.
- 2 Harrel, L.J., Andersen, G.L. and Wilson, K.H. (1995) Genetic variability of *Bacillus anthracis*
3 and related species. *J Clin Microbiol* **33**, 1847-1850.
- 4
- 5 Heinrichs, J.H., Beecher, D.J., MacMillan, J.D. and Zilinskas, B.A. (1993) Molecular cloning
6 and characterization of the *hbla* gene encoding the B component of hemolysin BL from
7 *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **175**, 6760-6766.
- 8
- 9 Helgason, E., Caugant, D.A., Lecadet, M.M., Chen, Y., Mahillon, J., Lövgren, A., Hegna, I.,
10 Kvaløy, K. and Kolstø, A.-B. (1998) Genetic Diversity of *Bacillus cereus*/*Bacillus*
11 *thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol* **37**, 80-87.
- 12
- 13 Helgason, E., Caugant, D.A., Olsen, I. and Kolstø, A.-B. (2000a) Genetic structure of
14 population of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates associated with periodontitis
15 and other human infections. *J Clin Microbiol* **38**, 1615-1622.
- 16
- 17 Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I.
18 and Kolstø, A.-B. (2000b) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* –
19 one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2627-2630.
- 20
- 21 Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A. and Kolstø, A.-B. (2004) Multilocus
22 sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* **70**,
23 191-201.
- 24
- 25 Heyndrickx, M. and Scheldeman, P. (2002) Bacilli Associated with Spoilage in Dairy
26 Products and Other Food. In *Applications and systematics of Bacillus and relatives* ed.
27 Berkeley, R., Heyndrickx, M.N. and de Vos, P. 1st ed., pp.64-82. Oxford: Blackwell Science
28 Ltda.
- 29
- 30 Hill, K.K., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K.A., Laker, M.,
31 Pardington, P.E., Richardson, A.P., Tonks, M., Beecher, D.J., Kemp, J.D., Kolstø, A.-B.,
32 Wong, A.C.L., Keim, P. and Jackson, P.J. (2004) Fluorescent amplified fragment length
33 polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*
34 Isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1068–1080.
- 35
- 36 Hilliard, N.J., Schelonka, R.L. and Waites, K.B. (2003) *Bacillus cereus* bacteremia in a
37 preterm neonate. *J Clin Microbiol* **41**, 3441-3444.
- 38
- 39 Hisieh, Y.M., Sheu, S.J., Chen, Y.L. and Tsen, H.Y. (1999) Enterotoxigenic profiles and
40 polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from
41 foods and food-borne outbreaks. *J Appl Microbiol* **87**, 481-490.
- 42
- 43 Irie, R., Fujita, Y. and Kobayashi, M. (1996) Nucleotide sequence and gene organization of
44 *gerK* spore germination locus of *Bacillus subtilis* 168. *J Gen Appl Microbiol* **42**, 141-153.
- 45
- 46 Itoua-Apoloyo, C., Drif, L., Vassal, M., DeBarjac, H., Bossy, J., Leclant, F. and Frutos, R.
47 (1995) Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the
48 European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4343-4347.
- 49

- 1 Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V.,
2 Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman,
3 E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Push, G., Haselkorn, R., Fonstein,
4 M., Ehrlich, S.D., Overbeek, R. and Kyrpides, N. (2003) The genome sequence of *Bacillus*
5 *cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**, 87-91.
6
- 7 Jadamus, A., Vahjen, W., Schäfer, K. and Simon, O. (2002) Influence of the probiotic strain
8 *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected
9 parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr*
10 **86**, 42-54.
11
- 12 Jarrett, P. and Stephenson, M. (1990) Plasmid transfer between strains of *Bacillus*
13 *thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl Environ Microbiol*
14 **56**, 1608–1614.
15
- 16 Johnson, D.E. (1976) Bacterial-membrane transport of beta-exotoxin, an anti-metabolite of
17 RNA-synthesis. *Nature* **260**, 333-335.
18
- 19 Juarez-Perez, V.M., Ferrandis, M.D. and Frutos, R. (1997) PCR-based approach for detection
20 of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2997–3002.
21
- 22 Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S.E., Richmond, K., Adair, D.M., Hugh-
23 Jones, M., Kuske, C.R. and Jackson, P. (1997) Molecular evolution and diversity in *Bacillus*
24 *anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* **179**,
25 818-824.
26
- 27 Ko, K.S., Kim, J.-W., Kim, J.-M., Kim, W., Chung, S., Kim, I.J. and Kook, Y.-H. (2004)
28 Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six
29 housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infect Immun* **72**, 5253-5261.
30
- 31 Kotiranta, A., Lounatmaa, K. and Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of
32 *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* **2**, 189-198.
33
- 34 Kramer, J.M. and Gilbert, R.J. (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In:
35 *Foodborne Bacterial Pathogens* ed. Doyle, M.P. pp.21-70. New York: Marcel Dekker.
36
- 37 Kramer, J.M., Turnbull, P.C.B., Munshi, G. and Gilbert, R.J. (1982) Identification and
38 characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food
39 poisoning. In *Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms* ed. Corry,
40 J.E.L., Roberts, D. and Skinner, F.A. pp.261-283. Florida: Academic Press.
41
- 42 Kumar, P., Ahuja, N. and Bhatnagar, R. (2001) Purification of anthrax edema factor from
43 *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective
44 antigen. *Infect Immun* **69**, 6532-6536.
45
- 46 Kumar, S. and Udayasuriyan, V. (2004) Cloning of *cry2Aa* and *cry2Ab* genes from new
47 isolates of *Bacillus thuringiensis* and their expression in recombinant *Bacillus thuringiensis*
48 and *Escherichia coli* strains. *World J Microbiol Biotechnol* **20**:11-17.
49

- 1 Kunst, E., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero,
 2 M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M.,
 3 Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M.,
 4 Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Danchin, A., Daniel, R.A.,
 5 Denizot, F., Devine, K.M., Düsterhöft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D.,
 6 Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S.,
 7 Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G.,
 8 Guiseppe, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hénaut, A., Hilbert, H.,
 9 Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D.,
 10 Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G.,
 11 Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee,
 12 S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R.P.,
 13 Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K.,
 14 Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S.,
 15 Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S.,
 16 Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E.,
 17 Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P.,
 18 Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K.,
 19 Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama,
 20 S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler,
 21 H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K.,
 22 Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Yoshikawa, H.F. and Zumstein, E. (1997) The
 23 complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-
 24 256.
 25
 26 La Duc, M.T., Satomi, M., Agata, N. and Venkateswaran, K. (2004) *gyrB* as a phylogenetic
 27 discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J Microbiol*
 28 *Methods* **56**, 283-294.
 29
 30 Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Pruss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart,
 31 G.S. and Schrer, S. (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant
 32 species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1373-1382.
 33
 34 Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S. and Sanchis, V. (1996) Identification of
 35 a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the
 36 phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J*
 37 *Bacteriol* **178**, 2749-2756.
 38
 39 Lereclus, D., Delécluse, A. and Lecadet, M.-M. (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis*
 40 toxins and genes. In *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and*
 41 *practice* ed. Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J. and Higgs, S. pp.37-60. Chichester: J.
 42 Wiley & Sons.
 43
 44 Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from
 45 *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature* **353**, 815-821.
 46
 47 Li, J., Koni, P.A. and Ellar, D.J. (1996) Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from
 48 *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol*
 49 *Biol* **257**, 129-152.
 50

- 1 Lund, T. and Granum, P.E. (1996) Characterization of a non-hamolytic enterotoxin complex
2 from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett* **141**, 151-156.
3
- 4 Mahler, H., Pasi, A., Kramer, J.M., Schulte, P., Scoging, A.C., Bar, W. and Krahenbuhl, S.
5 (1997) Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl*
6 *J Med* **336**, 1142-1148.
7
- 8 Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou,
9 J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. and Spratt, B.G. (1998) Multilocus
10 sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of
11 pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140-3145.
12
- 13 Majewski, J. and Cohan, F.M. (1999) Adapt globally, act locally: the effect of selective
14 sweeps on bacterial sequence diversity. *Genetics* **152**, 1459-1474.
15
- 16 Manasherob, R., Otieno-Ayayo, Z.N., Ben-Dov, E., Miaskovsky, R., Boussiba, S. and
17 Zaritsky, A. (2003) Enduring toxicity of transgenic *Anabaena* PCC 7120 expressing mosquito
18 larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis*. *Environ Microbiol* **5**, 997-1001.
19
- 20 Mäntynen, V. and Lindström, K. (1998) A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic
21 *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1634-1639.
22
- 23 Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C. and Comi, G. (2003) *Bacillus cereus*, *Bacillus*
24 *thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int J Food*
25 *Microbiol* **81**, 249-254.
26
- 27 Martin, P.A.W. and Travers, R.S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus*
28 *thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2437-2442.
29
- 30 Mayr, E. (1996) What is a Species, and What is Not? *Philos Sci* **63**, 262-277.
31
- 32 McClintock, J.T., Schaffer, C.R. and Sjoblad, R.D. (1995) A comparative review of the
33 mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic Sci* **45**: 95-105.
34
- 35 Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarret, P. and Burges, H.D. (1992) Distribution,
36 frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. *Appl Environ Microbiol*
37 **58**, 1344-1350.
38
- 39 Mignot, T., Mock, M., Robichon, D., Landier, A., Lereclus, D., Fouet, A. (1991) The
40 incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a
41 nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **42**, 1189-1198.
42
- 43 Mock, M. and Fouet, A. (2001) Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**, 647-671.
44
- 45 Mock, M. and Mignot, T. (2003) Anthrax toxins and the host: a history of intimacy. *Cell*
46 *Microbiol* **5**, 15-23.
47
- 48 Mourez, M., Lacy, D.B., Cunningham, K., Legmann, R., Sellman, B.R., Mogridge, J. and
49 Collier, R.J. (2002) 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends*
50 *Microbiol* **10**, 287-293.

- 1 Moyaeri, M. and Leppla, S.H. (2004) The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin*
2 *Microbiol* **7**, 19-24.
3
- 4 Nakamura, L.K. (1998) *Bacillus pseudomycoloides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1031-1035.
5
- 6 Obukowicz, M.G., Perlak, F.J., Kusano-kretzmer, K., Mayer, E.J. and Watrud, L.S. (1986)
7 Integration of the Delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of
8 root-colonizing strains of Pseudomonads using Tn5. *Gene* **45**, 327-331.
9
- 10 Ochman, H., Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature
11 of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299-304.
12
- 13 Okinaka, R.T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Keim, P., Koehler,
14 T.M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R.
15 and Jackson, P.J. (1999a) Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis*
16 plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol* **181**, 6509-6515.
17
- 18 Okinaka, R., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A., Hill, K., Keim, P., Koehler, T., Lamke,
19 G., Kumano, S., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R. and Jackson, P. (1999b)
20 Sequence, assembly and analysis of pX01 and pX02. *J Appl Microbiol* **87**, 261-262.
21
- 22 Pannifer, A.D., Wong, T.Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J.,
23 Lacy, D.B., Collier, R.J., Park, S., Leppla, S.H., Hanna, P. and Liddington, R.C. (2001)
24 Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* **414**, 229-233.
25
- 26 Peng, R., Xiong, A., Li, X., Fuan, H. and Yao, Q. (2003) A delta-endotoxin encoded in
27 *Pseudomonas fluorescens* displays a high degree of insecticidal activity. *Appl Microbiol*
28 *Biotechnol* **63**, 300-306.
29
- 30 Pezard, C., Berche, P. and Mock, M. (1991) Contribution of individual toxin components to
31 virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **59**, 3472-3477.
32
- 33 Pezard, C., Duflot, E. and Mock, M. (1993) Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains
34 producing a single toxin component. *J Gen Microbiol* **139**, 2459-2463.
35
- 36 Poyart, C., Quesne, G., Coulson, S., Berche, P. and Trieu-Cuot, P. (1998) Identification of
37 streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent
38 superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* **36**, 41-47.
39
- 40 Poyart, C., Quesne, G. and Trieu-Cuot, P. (2000) Sequencing the gene encoding manganese-
41 dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin*
42 *Microbiol* **38**, 415-418.
43
- 44 Prefontaine, G., Fast, P., Lau, P.C.K., Hefford, M.A., Hanna, Z. and Brousseau, R. (1987)
45 Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among
46 *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2808-2814.
47
- 48 Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W.J., Holmes, E.C. and Maiden, M.C.J. (2004) Population
49 structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **186**, 7959-7970.
50

- 1 Průb, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtlbauer, E. and Scherer, S. (1999) The hemolytic
2 enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl*
3 *Environ Microbiol* **65**, 5436-5442.
- 4
- 5 Radnedge, L., Agron, P.G., Hill, K.K., Jackson, P.J., Ticknor, L.O., Keim, P. and Andersen,
6 G.L. (2003) Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and
7 *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2755-2764.
- 8
- 9 Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S. and Ravel, J. (2005) Genomics of the *Bacillus cereus*
10 group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 303-329.
- 11
- 12 Rasko, D.A., Ravel, J., Èkstad, O.A., Helgason, E., Cer, R.Z., Jiang, L., Shores, K.A., Fouts,
13 D.E., Tourasse, N.J., Angiuoli, S.V., Kolonay, J., Nelson, W.C., Kolstø, A.-B., Fraser, C.M.
14 and Read, T.D. (2004) The genome of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic
15 adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res* **32**,
16 977-988.
- 17
- 18 Read, T.D., Peterson, S.N., Tourasse, N., Baillie, L.W., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin,
19 H., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Holtzapple, E.K., Økstad, O.A., Helgason, E.,
20 Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J.F., Beanan, M.J., Dodson, R.J., Brinkac, L.M., Gwinn, M.,
21 Deboy, R.T., Madpu, R., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., Haft, D.H., Nelson, W.C., Peterson,
22 J.D., Pop, M., Khouri, H.M., Radune, D., Benton, J.L., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I.R.,
23 Weidman, J.F., Berry, K.J., Plaut, R.D., Wolf, A.M., Watkins, K.L., Nierman, W.C., Hazen,
24 A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J.E., White, O., Salzberg, S.L., Thomason, B.,
25 Friedlander, A.M., Koehler, T.M., Hanna, P.C., Kolstø, A.-B. and Fraser, C.M. (2003) The
26 genome sequence of *Bacillus anthracis* AMES and comparison to closely related bacteria.
27 *Nature* **423**, 81-86.
- 28
- 29 Read, T.D., Salzberg, S.L., Mihai, P., Shumway, M., Umayam, L., Jiang, L., Holtzapple, E.,
30 Busch, J.D., Smith, K.L., Schupp, J.M., Solomon, D., Keim, P., Fraser, C.M.1. (2002)
31 Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*.
32 *Science* **296**, 2028-2033.
- 33
- 34 Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S. and Chaithong, T.
35 (2001) Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after
36 growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3873-3881.
- 37
- 38 Ryan, P.A., MacMillan, J.M. and Zilinskas, B.A. (1997) Molecular cloning and
39 characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from
40 *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **179**, 2551-2556.
- 41
- 42 Sanchis, V. (2000) Biotechnological improvement of *Bacillus thuringiensis* for agricultural
43 control of insect pests: benefits and ecological implications. In: *Entomopathogenic bacteria:*
44 *from laboratory to field application* ed. Charles, J.F., Delècluse, A. and Nielsen-Le Roux, C.
45 pp.441-459. England: Kluwer Academic Publishers.
- 46
- 47 Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rien, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R.
48 and Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol*
49 *Mol Biol Rev* **62**, 775-806.
- 50

- 1 Schraft, H., Griffiths, M.W. (1995) Specific oligonucleotide primers for detection of
2 lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* **61**, 98-102.
3
- 4 Schupp, J.M., Klevytska, A.M., Zinser, G., Price, L.B. and Keim, P. (2000) *vrpB*, a
5 hypervariable Open Reading Frame in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**, 3989-3997.
6
- 7 Serevin, A., Tabei, K. and Tomasz, A. (2004) The structure of the cell wall peptidoglycan of
8 *Bacillus cereus* RSVF1, a strain closely related to *Bacillus anthracis*. *Microb Drug Resist* **10**,
9 77-82.
- 10
- 11 Shelton, A.M., Zhao, J.-Z. and Roush, R.T. (2002) Economic, ecological, food safety, and
12 social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Ann Rev Entomol* **47**, 845-881.
13
- 14 Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J. and Pang, Y. (2004) Expression of *vip1/vip2*
15 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *J*
16 *Appl Microbiol* **97**, 757-765.
17
- 18 Sims, S.R. and Holden, L.R. (1996) Insect bioassay for determining soil degradation of
19 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissue. *Environ Entomol* **25**,
20 659-664.
21
- 22 Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M., Vilas-Bôas, G., Fouet, A., Mock, M., Sanchis, V.,
23 Chaufaux, J., Gohar, M. and Lereclus, D. (2004) Distinct mutations in PlcR explain why
24 some strains of *Bacillus cereus* group are non-hemolytic. *J Bacteriol* **186**, 3531-3538.
25
- 26 Smith, R.A.; and Couche, G.A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*
27 variants. *Appl Environ Microbiol* **57**, 311-331.
28
- 29 Spencer, R.C. (2003) *Bacillus anthracis*. *J Clin Pathol* **56**, 182-187.
30
- 31 Spratt, B.G. (1999) Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an
32 era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* **2**, 312-316.
33
- 34 Tanapongpipat, S., Luxananil, P., Promdonkoy, B., Chewawiwat, N., Audtho, M. and
35 Panyim, S. (2003) A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from
36 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a
37 broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol*
38 *Lett* **228**, 259-263.
39
- 40 Thomas, D.J.I., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M. and Saunders, J.R. (2000) Plasmid transfer
41 between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture
42 and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol* **66**, 118-124.
43
- 44 Thomas, D.J.I., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M. and Saunders, J.R. (2001) Plasmid transfer
45 between the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain in laboratory culture and river
46 water, and Dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol* **67**, 330-338.
47
- 48 Thorne, C.B. (1993) *Bacillus anthracis*. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*
49 ed. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. pp 113-124. Washington, DC: American
50 Society of Microbiology.

- 1 Ticknor, L.O., Kolstø, A.-B., Hill, K., Keim, P., Laker, M.T., Tonks, M. and Jackson, P.J.
2 (2001) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus*
3 *cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4863-4873.
4
- 5 Tomasino, S.F., Leister, R.T., Dimock, M.B., Beach, R.M. and Kelly, J.L. (1995) Field
6 performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal crystal protein
7 gene *cryIA(c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. *Biol*
8 *Control* **5**, 442-448.
9
- 10 Tomita, M., Taguchi, R. and Ikezawa, H. (1983) The action of sphingomyelinase of *Bacillus*
11 *cereus* on bovine erythrocyte membrane and liposomes. Specific adsorption onto these
12 membranes. *J Biochem* **93**, 1221-1230.
13
- 14 Tonello, F., Ascenzi, P. and Montecucco, C. (2003) The metalloproteolytic activity of the
15 anthrax lethal factor is substrate-inhibited. *J Biol Chem* **278**, 40075-40078.
16
- 17 Turnbull, P.C.B. (1991) Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine* **9**, 533-539.
18
- 19 Turnbull, P.C.B., Hutson, R.A., Ward, M.J., Jones, M.N., Quinn, C.P., Finnie, N.J.,
20 Duggleby, C.J., Kramer, J.M. and Melling, J. (1992) *Bacillus anthracis* but not always
21 anthrax. *J Appl Bact* **72**, 21-28.
22
- 23 Turnbull, P.C.B., Jørgensen, K., Kramer, J.M., Gilbert, R.J. and Parry, J.M. (1979) Severe
24 clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins.
25 *J Clin Pathol* **32**, 289-293.
26
- 27 Turnbull, P.C.B. and Kramer, J.M. (1983) Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an
28 analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period. *J Clin Pathol* **36**,
29 1091-1096.
30
- 31 van Schaik, W., Zwietering, M.H., de Vos, W.M. and Abee, T. (2004) Identification of
32 sigma(B)-dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and in vitro transcription analysis.
33 *J Bacteriol* **186**, 4100-4109.
34
- 35 van Valen, L. (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* **25**, 233-239.
36
- 37 Vilas-Bôas, G.T. and Lemos, M.V.F. (2004) Diversity of *cry* genes and genetic
38 characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Can J Microbiol* **50**, 605-613.
39
- 40 Vilas-Bôas, G.T., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F. and Bourguet, D. (2002) Genetic
41 differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.
42 *Appl Environ Microbiol* **68**, 1414-1424.
43
- 44 Vilas-Bôas, G.F.L.T., Vilas-Bôas, L.A., Lereclus, D. and Arantes, O.M.N. (1998) *Bacillus*
45 *thuringiensis* conjugation under environmental conditions. *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 369-
46 374.
47
- 48 Vilas-Bôas, L.A., Vilas-Bôas, G.F.L.T., Saridakis, H.O., Lemos, M.V.F., Lereclus, D. and
49 Arantes, O.M.N. (2000) Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil
50 microcosm. *FEMS Microbiol Ecol* **31**, 255-259.

- 1 Wazny, T.K., Mummaw, N. and Styr, B. (1990) Degranulation of human neutrophils after
2 exposure to bacterial phospholipase C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**, 830-832.
3
- 4 Welkos, S.L. (1991) Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pXO1⁻) *Bacillus*
5 *anthracis*. *Microb Pathog* **10**, 183-198.
6
- 7 Welkos, S.L., Vietri, N.J. and Gibbs, P.H. (1993) Non-toxigenic derivatives of Ames strain of
8 *Bacillus anthracis* are fully virulence for mice: role of plasmid pXO2 and chromosome in
9 strain-dependent virulence. *Microb Pathog* **14**, 381-388.
10
- 11 WHO (World Health Organization) (1999) International programme on chemical safety
12 (IPCS): microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Health Criteria*
13 **217**, 1–105.
14
- 15 Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221–271.
16
- 17 Wisniewski, J.P., Frangne, N., Massonneau, A. and Dumas, C. (2002) Between myth and
18 reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie*
19 **84**, 1095-103.
20
- 21 Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N. and Venkateswaran, K. (1999) Cloning and nucleotide
22 sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis*
23 and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1483-
24 1490.
25
- 26 Yamamoto, S. and Harayama, S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB*
27 genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of
28 *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1104-1109.

1 Table 1. Characteristics of the two types of disease caused by *Bacillus cereus* (from Granum,
2 2002).

3

	Diarrheal Syndrome	Emetic Syndrome
Infective dose	10^5 - 10^7 (total)	10^5 - 10^8 cells per gram food to produce enough emetic toxin
Toxin produced	In the small intestine of the host	Preformed in foods
Type of toxin	Protein (s)	Cyclic peptide
Incubation period	8-16 h (occasionally > 24h)	0.5-5 h
Duration of illness	12-24 h (occasionally several days)	6-24 h
Symptoms	Abdominal pain, watery diarrhea (occasionally bloody diarrhea), sometimes with nausea	Nausea, vomiting and malaise (sometimes followed by diarrhea, owing to additional enterotoxin production?)
Food most frequently implicated	Meat products, soups, vegetables, puddings/sauces and milk/milk products	Fried and cooked rice, pasta, pastry and noodles

4

1 Table 2. A few basic characteristics for the identification of species of *Bacillus cereus*,
 2 *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*.

3

	Species		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Anaerobic growth	+	+	+
Catalase production	+	+	+
Citrate utilization	+	V	+
Casein ydrolysis	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+
Voges-Proskauer (V-P) reaction	+	+	+
pH in V-P medium < 6,0	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+
Growth at 60°C	-	-	-
Acid from AS glucose	+	+	+
Acid + Gas from AS glicose	-	-	-
Lysis by Gamma phage	-	+	-
Motility	+ ^a	-	+ ^a
Hemolysis on sheep blood agar	+ ^a	-	+ ^a
Resistance to β -lactam antibiotics	+ ^a	-	+ ^a
Glutamyl-polypeptide capsule	-	+	-
Parasporal bodies	-	-	+

4 ^a more than 95% of the strains; V, variable; -, negative; +, positive.

5. REFERÊNCIAS

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Editora Agropecuária, 2002. p. 269-293.

AGAISSE, H. et al. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 1043-1053, 1999.

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6027-6032, 1995.

AGATA, N. et al. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, p. 31-34, 1994.

AGATA, N. et al. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. **Microbiology**, v. 141, p. 983-988, 1995.

ALY, C.; MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 46, p. 251-258, 1985.

ASH, C.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 73, p. 75-80, 1992.

ASH, C. et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 343-346, 1991a.

ASH, C. et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 202-206, 1991b.

BAIDA, G. E.; KUZMIN, N. P. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1264, p. 151-154, 1995.

BARKER, M.; THAKKER, B.; PRIEST, F. G. Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 179-184, 2005.

BAVYKIN, S. G. et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3711-3730, 2004.

BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: ENTWISTLE, P. F. et al. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: J. Wiley & Sons, 1993. p. 147-170.

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

BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 233-239, 1997.

BERNHARD, K. et al. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 59-68, 1997.

BOURGOGNE, A. et al. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2736-2743, 2003.

BOURGUET, D. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer: what chance for Bt maize? **Physiological Entomology**, v. 29, p. 251-256, 2004.

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

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

CALLEGAN, M. C. et al. Molecular mechanisms of *Bacillus endophthalmitis* pathogenesis. **DNA and Cell Biology**, v. 21, p. 367-373, 2002.

CARLSON, C. R.; CAUGANT, D. A.; KOLSTØ, A. B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1719-1725, 1994.

CHANG, Y. H. et al. PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. **Applied and Environmental Microbiology** v. 69, p. 4502-4510, 2003.

CHAUHAN, V.; BHATNAGAR, R. Identification of aminoacid residues of anthrax protective antigen involved in binding with lethal factor. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4477-4484, 2002.

CHEN, J. et al. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 310-316, 2003.

CHERIF, A. et al. Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 456-462, 2002.

CHERIF, A. et al. Genetic Relationship in the '*Bacillus cereus* group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 1108-1119, 2003.

CHILCOTT, C. N.; WIGLEY, P. J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 244-247, 1993.

CHOPRA. A. P. et al. Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 9402-9406, 2003.

CLEMENTS, M. O.; MOIR, A. Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 6729-6735, 1998.

COHAN, F. M. The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary divergence in prokaryotes. **The American Naturalist**, v. 143, p. 965-986, 1994.

COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 457-487, 2002.

COLLIER, R. J.; YOUNG, J. A. T. Anthrax Toxin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 45-70, 2003.

COOLBAUGH, J. C.; WILLIAMS, R. P. Production and characterization of two hemolysins of *Bacillus cereus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 1289-1295, 1978.

CORFE, B. M. et al. The *gerB* region of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome encodes a homologue of the *gerA* spore germination operon. **Microbiology**, v. 140, p. 471-478, 1994.

COWELL, J. L.; GRUSHOFF-KOSYK, P. S.; BERNHEIMER, A. W. Purification of cereolysin and the electrophoretic separation of the active (reduced) and inactive (oxidized) forms of the purified toxin. **Infection and Immunity**, v. 14, p. 144-154, 1976.

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

DING, Y. et al. Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human periodontal diseases. **Oral Diseases**, v. 1, p. 279-286, 1995.

DOOLITTLE, W. F. Genes in pieces: where they ever together? **Nature**, v. 272, p. 581-582, 1978.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, p. 324-338, 1993.

DRUM, C. L. et al. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. **Nature**, v. 415, p. 396-402, 2002.

DRYSDALE, M. et al. *atxA* controls *Bacillus anthracis* capsule synthesis via *acpA* and a newly discovered regulator, *acpB*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 307-315, 2004.

DUC, L. H. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2161-2171, 2004.

ESTRUCH, J. J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5389–5394, 1996.

FEDERICI, B. A. et al. Recombinant bacteria for mosquito control. **The Journal Experimental Biology**, v. 206, p. 3877-3885, 2003.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FERREIRA, L. H. P. L. et al. Ecological aspects of *Bacillus thuringiensis* in an oxisol. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 19-20, 2003.

FOUET, A.; MESNAGE, S. (2002) *Bacillus anthracis* cell envelope components. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 271, p. 87-113, 2002.

GHELARDI, E. et al. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 129-134, 2002.

GILMORE, M. S. et al. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 744–753, 1989.

GILSON, E. et al. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **The EMBO Journal**, v. 3, p. 1417-1421, 1984.

GILSON, E. et al. A subfamily of *E. coli* palindromic units implicated in transcription termination? **Annales d'Institut Pasteur. Microbiology**, v. 137B, p. 259-270, 1986.

GILSON, E. et al. Palindromic units: a case of highly repetitive DNA sequences in bacteria. **Trends in genetics: TIG**, v. 3, p. 226-230, 1987.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3941-3952, 1990.

GINSBURG, A. S. et al. Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenic enterocolitis during treatment of acute leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 72, p. 204-208, 2003.

GOH, S. H. et al. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 3116-3121, 1997.

GOHAR, M. et al. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. **Proteomics**, v. 2, p. 784-791, 2002.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.

GOUNDER, R.; RAJENDRAN, N. Transformation studies of *Bacillus thuringiensis cryIC* gene into a nitrogen-fixing *Azospirillum lipoferum*. **Z. Naturforsch. [C]**, v. 56, p. 245-248, 2001.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and Food Poisoning. In: BERKELEY, R.; HEYNDRIKX, M. N.; DE VOS, P. (Eds.). **Applications and systematics of *Bacillus* and relatives**. Oxford: Blackwell Science Ltda, 2002. p. 37-46.

GRANUM, P. E.; BAIRD-PARKER, T. C. *Bacillus* spp. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. (Eds.). **The Microbiological Safety and Quality of Food**. Maryland: Aspen Publishers, 2000. p. 1029-1039.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223-228, 1997.

GRANUM, P. E.; NISSEN, H. Sphingomyelinase is part of the 'enterotoxin complex' produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p. 97-100, 1993.

GREEN, B. D. et al. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**, v. 49, p. 291-297, 1985.

GROCHULSKI, P. et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 254, p. 447-464, 1995.

GUIDI-RONTANI, C. et al. Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXOI of *Bacillus anthracis*. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 407-414, 1999.

GUIDI-RONTANI, C. et al. V. Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors across endosome membranes. **Cellular Microbiology**, v. 2, p. 259-264, 2000.

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

HANSEN, B. M. et al. *Bacillus thuringiensis*, ecology and environmental effects of its use for microbial pest control (**Environmental Project No. 316**). Copenhagen, Denmark, Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency, 1996.

HANSEN, B. M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 106-114, 1998.

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

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds.). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-54.

HARDIN, G. The competitive exclusion principle. **Science**, v. 131, p. 1292-1297, 1960.

HARREL, L. J.; ANDERSEN, G. L.; WILSON, K. H. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1847-1850, 1995.

HEINRICHS, J. H. et al. Molecular cloning and characterization of the *hbla* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6760-6766, 1993.

HELGASON, E. et al. Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis* isolates from natural sources. **Current Microbiology**, v. 37, p. 80-87, 1998.

HELGASON, E. et al. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1615-1622, 2000a.

HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2627-2630, 2000b.

HELGASON, E. et al. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 191-201, 2004.

HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M. The presence of intragenically located REP-like elements in *Bacillus sporothermodurans* is sufficient for REP-PCR typing. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 255-261, 2000.

HEYNDRICKX, M.; SCHELDEMAN, P. Bacilli Associated with Spoilage in Dairy Products and Other Food. In: BERKELEY, R.; HEYNDRICKX, M. N.; DE VOS, P. (Eds.). **Applications and systematics of *Bacillus* and relatives**. Oxford: Blackwell Science Ltda, 2002. p. 64-82.

HIGGINS, C. F. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v. 298, p. 760-762, 1982.

HIGGINS, D. F.; MCLAREN, R. S.; NEWBURY, S.F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. **Gene**, v. 72, p. 3-14, 1988.

HILL, K. K. et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1068–1080, 2004.

HILLIARD, N. J.; SCHELONKA, R. L.; WAITES, K. B. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3441-3444, 2003.

HISIEH, Y. M. et al. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 481-490, 1999.

HOUCK, C. M.; RINEHART, F. P.; SCHMID, C. W. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. **Journal of Molecular Biology**, v. 132, p. 289-306, 1979.

HUDSON, G. S.; DAVIDSON, B. E. Nucleotide sequence and transcription for the phenylalanine and tyrosine operons of *E. coli* K12. **Journal of Molecular Biology**, v. 180, p. 1023-1051, 1984.

IRIE, R.; FUJITA, Y.; KOBAYASHI, M. Nucleotide sequence and gene organization of *gerK* spore germination locus of *Bacillus subtilis* 168. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, p. 141-153, 1996.

ITOUA-APOLOYO, C. et al. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4343-4347, 1995.

IVANOVA, N. et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. **Nature**, v. 423, p. 87-91, 2003.

JADAMUS, A. et al. Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 86, p. 42-54, 2002.

JARRETT, P.; STEPHENSON, M. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1608–1614, 1990.

JELINEK, W. R. et al. Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 1398-1402, 1980.

JOHNSON, D. E. Bacterial-membrane transport of beta-exotoxin, an anti-metabolite of RNA-synthesis. **Nature**, v. 260, p. 333-335, 1976.

JUAREZ-PEREZ, V. M.; FERRANDIS, M. D.; FRUTOS, R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2997–3002, 1997.

KEIM, P. et al. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 818-824, 1997.

KIM, W. et al. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 207, p. 21-27, 2001.

KO, K. S. et al. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5253-5261, 2004.

KOMINE, Y. et al. Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, p. 579-598, 1990.

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

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21-70.

KRAMER, J. M. et al. Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. In: CORRY, J. E. L.; ROBERTS, D.; SKINNER, F. A. (Eds.). **Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms**. Florida: Academic Press, 1982. p. 261-283.

KUMAR, P.; AHUJA, N.; BHATNAGAR, R. Purification of anthrax edema factor from *Escherichia coli* and identification of residues required for binding to anthrax protective antigen. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6532-6536, 2001.

KUMAR, S.; UDAYASURIYAN, V. Cloning of *cry2Aa* and *cry2Ab* genes from new isolates of *Bacillus thuringiensis* and their expression in recombinant *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 11-17, 2004.

KUNST, E. et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, p. 249-256, 1997.

LA DUC, M. T. et al. (2004) *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 283-294, 2004.

LECHNER, S. et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1373-1382, 1998.

LERECLUS, D. et al. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 2749–2756, 1996.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADDET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F. et al. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: J. Wiley & Sons, 1993. p.37-60.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353, p. 815-821, 1991.

LI, J.; KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 257, p. 129-152, 1996.

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

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4525-4529, 1992.

MAHLER, H. et al. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1142-1148, 1997.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MAJEWSKI, J.; COHAN, F. M. Adapt globally, act locally: the effect of selective sweeps on bacterial sequence diversity. **Genetics**, v. 152, p. 1459-1474, 1999.

MANASHEROB, R. et al. Enduring toxicity of transgenic *Anabaena* PCC 7120 expressing mosquito larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis*. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 997-1001, 2003.

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

MANZANO, M. et al. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 249-254, 2003.

MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2437-2442, 1989.

MAYR, E. What is a Species, and What is Not? **Philosophy of Science**, v. 63, p. 262-277, 1996.

MCCLINTOCK, J. T.; SCHAFFER, C. R.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Pesticide Science**, v. 45, p. 95-105, 1995.

MEADOWS, M. P. et al. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1344-1350, 1992.

MERINO, E. et al. Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. **Gene**, v. 58, p. 305-309, 1987.

MIGNOT, T. et al. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 1189-1198, 2001.

MITEVA, V.; SELENSKA-POBELL, S.; MITEV, V. Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 928-936, 1999.

MOCK, M.; FOUET, A. Anthrax. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 647-671, 2001.

MOCK, M.; MIGNOT, T. Anthrax toxins and the host: a history of intimacy. **Cellular Microbiology**, v. 5, p. 15-23, 2003.

MOUREZ, M. et al. 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 287-293, 2002.

MOYAERI, M.; LEPPLA, S. H. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 19-24, 2004.

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

NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1031-1035, 1998.

NEWBURY, S. F.; SMITH, N. H.; HIGGINS, C. F. Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. **Cell**, v. 51, p. 1131-1143, 1987.

NEWBURY, S. F. et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, v. 48, p. 297-310, 1987.

OBUKOWICZ, M. G. et al. Integration of the Delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of Pseudomonads using Tn5. **Gene**, v. 45, p. 327-331, 1986.

OHBA, M.; AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 277-282, 1986.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299-304, 2000.

OKINAKA, R. T. et al. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6509-6515, 1999a.

OKINAKA, R. et al. Sequence, assembly and analysis of pXO1 and pXO2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 261-262, 1999b.

PANNIFER, A. D. et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. **Nature**, v. 414, p. 229-233, 2001.

PENG, R. et al. A delta-endotoxin encoded in *Pseudomonas fluorescens* displays a high degree of insecticidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 300-306, 2003.

PEZARD, C.; BERCHE, P.; MOCK, M. Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 3472-3477, 1991.

PEZARD, C.; DUFLOT, E.; MOCK, M. Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2459-2463, 1993.

PHUCHAROEN, K.; CHUNGJATUPORNCHAI, W.; PANYIM, S. Differentiation of *Bacillus thuringiensis* subspecies using repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) genomic fingerprinting. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 7, p. 79-83, 1999.

POYART, C. et al. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 41-47, 1998.

POYART, C.; QUESNE, G.; TRIEU-CUOT, P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 415-418, 2000.

PREFONTAINE, G. et al. Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2808-2814, 1987.

PRIEST, F. G. et al. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 7959-7970, 2004.

PRÜß, B. M. et al. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5436-5442, 1999.

RABINOVITCH, L. et al. Evaluation of the incidence and toxicity of samples of *Bacillus cereus* in various classes of foods sold and consumed in the State of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 1-9, 1985.

RADNEDGE, L. et al. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2755-2764, 2003.

RASKO, D. A. et al. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 303-329, 2005.

RASKO, D. A. et al. The genome of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 977-988, 2004.

READ, T. D. et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* AMES and comparison to closely related bacteria. **Nature**, v. 423, p. 81-86, 2003.

READ, T. D. et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. **Science**, v. 296, p. 2028-2033, 2002.

RIKKE, B. A., GARVIN, L. D.; HARDIES, S. C. Systematic identification of LINE-1 repetitive DNA sequence differences having species specificity between *Mus spretus* and *Mus domesticus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, p. 635-643, 1991.

RILEY, M.; KRAWIEC, S. Genome organization. In: NEIDHARDT, F. C. et al. (Eds.). ***Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology***. v. 2. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 967-981.

ROHLF, F. J. NTSYSpc: numerical taxonomy system. Version 2.1. Exeter Publishing, Ltd. Setauket, NY, 2002.

ROSSELLO-MORA, R. Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 323-326, 2003.

ROWAN, N. J. et al. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3873-3881, 2001.

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

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHIS, V. Biotechnological improvement of *Bacillus thuringiensis* for agricultural control of insect pests: benefits and ecological implications. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. England: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 441-459.

SCHMID, C. W.; JELINEK, W. R. The Alu family of dispersed repetitive sequences. **Science**, v. 216, p. 1065-1070, 1982.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SCHRAFT, H.; GRIFFITHS, M. W. Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 98-102, 1995.

SCHUPP, J. M. et al. *vrrB*, a hypervariable Open Reading Frame in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3989-3997, 2000.

SEBESTA, K.; HORSKA, K. Mechanisms of inhibition of DNA dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 209, p. 357-376, 1970.

SEREVIN, A.; TABEL, K.; TOMASZ, A. The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bacillus cereus* RSVF1, a strain closely related to *Bacillus anthracis*. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, p. 77-82, 2004.

SHANGKUAN, Y. H. et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 452-462, 2000.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6503-6508, 1990.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 845-881, 2002.

SHI, Y. et al. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 757-765, 2004.

SILVA, S. M.; RABINOVITCH, L.; ROBBS, P. G. Quantification and behavioral characterization of *Bacillus cereus* in formulated infant foods. I-Generation time. **Revista de Microbiologia**, v. 24, p. 125-131, 1993.

SIMS, S. R.; HOLDEN, L. R. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissue. **Environmental Entomology**, v. 25, p. 659-664, 1996.

SLAMTI, L. et al. Distinct mutations in PlcR explain why some strains of *Bacillus cereus* group are non-hemolytic. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 3531-3538, 2004.

SMITH, J. M.; FEIL, E. J.; SMITH, N. H. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 22, p. 1115-1122, 2000.

SMITH, J. M. et al. How clonal are bacteria? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 4384-4388, 1993.

SMITH, R. A.; COUCHE, G. A. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 311-331, 1991.

SOUTO, G. I. et al. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1247-1256, 2004.

SPENCER, R. C. *Bacillus anthracis*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 182-187, 2003.

SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 312-316, 1999.

STERN, M.; PROSSNITZ, E.; AMES, G. F. L. Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 141-152, 1988.

STERN, M. J. et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, p. 1015-1026, 1984.

TANAPONGPIPAT, S. et al. A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 259-263, 2003.

THOMAS, D. J. I. et al. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 118-124, 2000.

THOMAS, D. J. I. et al. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain in laboratory culture and river water, and Dipteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 330-338, 2001.

THORNE, C. B. *Bacillus anthracis*. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Eds.). **Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1993. p. 113-124.

TICKNOR, L. O. et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4863-4873, 2001.

TOMASINO, S. F. et al. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal crystal protein gene *cryIA(c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control: Theory and Applications in Pest Management**, v. 5, p. 442-448, 1995.

TOMITA, M.; TAGUCHI, R.; IKEZAWA, H. The action of sphingomyelinase of *Bacillus cereus* on bovine erythrocyte membrane and liposomes. Specific adsorption onto these membranes. **Journal of Biochemistry**, v. 93, p. 1221-1230, 1983.

TONELLO, F.; ASCENZI, P.; MONTECUCCO, C. The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 40075-40078, 2003.

TURNBULL, P. C. B. Anthrax vaccines: past, present and future. **Vaccine**, v. 9, p. 533-539, 1991.

TURNBULL, P. C. B. *Bacillus*. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 1996.
Disponível em: <<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch015.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2005.

TURNBULL, P. C. B. et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 21-28, 1992.

TURNBULL, P. C. B. et al. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, p. 289-293, 1979.

TURNBULL, P. C. B.; KRAMER, J. M. Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, p. 1091-1096, 1983.

VAN BELKUM, A. et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 62, p. 275-293, 1998.

VAN SCHAIK, W. et al. Identification of sigma(B)-dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and in vitro transcription analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4100-4109, 2004.

VAN VALEN, L. Ecological species, multispecies, and oaks. **Taxon**, v. 25, p. 233-239, 1976.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 605-613, 2004.

VILAS-BÔAS, G. T. et al. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1414-1424, 2002.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T. et al. *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 369-374, 1998.

VILAS-BÔAS, L. A. et al. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 255-259, 2000.

WAZNY, T. K.; MUMMAW, N.; STYRT, B. Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 9, p. 830-832, 1990.

WELKOS, S. L. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pXO1⁻) *Bacillus anthracis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 10, p. 183-198, 1991.

WELKOS, S. L.; VIETRI, N. J.; GIBBS, P. H. Non-toxigenic derivatives of Ames strain of *Bacillus anthracis* are fully virulence for mice: role of plasmid pXO2 and chromosome in strain-dependent virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 14, p. 381-388, 1993.

WHO (World Health Organization). International programme on chemical safety (IPCS): microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. **Environmental Health Criteria**, v. 217, p. 1-105, 1999.

WISNIEWSKI, J. P. et al. Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. **Biochimie**, v. 84, p. 1095-103, 2002.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

YAMADA, S. et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1483-1490, 1999.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1104-1109, 1995.

YANG, Y.; AMES, G. F. L. The family of repetitive extragenic palindromic sequences: interaction with DNA gyrase and histone-like protein HU. In: DRLICA, K. e RILEY, M. (Eds.). **The Bacterial Chromosome**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1990. p. 211-225.

YANG, Y; AMES, G. F. L. DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 8850-8854, 1988.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)