DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE
Bacillus thuringiensis BERLINER, 1915
EM LARVAS DE INSETOS

WALKYRIA CANUTILHO LAVINI

Orientador: NELSON SUPLICY FILHO

Dissertação apresentada à Es
cola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Univer
sidade de São Paulo, para ob
tenção do título de Mestre
em Entomologia

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro, 1981

A meus pais,

esposo e

filhos,

DEDICO

Ao Dr. Brasília Seraphim de Oliveira Junior,

pela amizade, estímulo científico
e colaboração inestimável,

minha profunda gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Nelson Suplicy Filho, Diretor da Divisão de Parasitologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo, pela orientação, incentivo e apoio na elaboração desta tese.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, na pessoa do Dr. Jorge Abrahão, ex-Diretor da Divisão de Atividades Técnicas Complementares, por ter possibilitado a realização do curso de pós-graduação e deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pela amizade e ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, pelo fornecimento de materiais para diagnóstico.

Ao Dr. Antonio Joaquim Rossini, professor do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, pela atenção dedicada.

Ao Sr. Sérgio Vianna, chefe da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico de São Paulo, pela preciosa

colaboração na documentação fotomicrográfica.

À Sra. Helena V. Franco do Amaral, chefe da Seção de Desenho do Instituto Biológico de São Paulo e a sua dedicada equipe, pelos serviços prestados.

Ao Sr. Luiz Carlos Veríssimo, funcionário da Biblioteca Central da ESALQ-USP, pela ajuda prestada na pesquisa bibliográfica.

Ao Dr. Itsuro Myazaki, colega do curso de pós-graduação, pelas gentilezas recebidas.

À Profa. Karin Falck, pela atenciosa revisão do resumo em inglês.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização desta tese, em especial ao fotógrafo Mateus Schwarz e à datilógrafa Nyelse Sá Trench Martins.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Introdução	6
3.2. Taxonomia	7
3.3. Propriedades morfológicas e bioquímicas	13
3.4. Fisiologia	15
3.4.1. Exigências nutricionais	15
3.4.2. Propriedades metabólicas	17
3.4.3. Toxinas produzidas	18
3.4.3.1. B.t. α - exotoxina	19
3.4.3.2. B.t. β - exotoxina	21
3.4.3.3. B.t. γ - exotoxina	23
3.4.3.4. B.t. δ - endotoxina	24
3.4.3.4.1. Introdução	24
3.4.3.4.2. Biosíntese do cristal proteico	25
3.4.3.4.3. Estrutura do cristal	29

3.4.3.4.4. Sorologia da proteína do cristal	31
3.4.3.4.5. Bioquímica da proteína do cristal	33
3.4.3.4.6. Modo de ação	40
3.4.3.4.7. Patogenicidade	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1. Temperatura de incubação	58
4.2. Isolamento	58
4.3. Caracteres citobacterioscópicos	60
4.3.1. Coloração de Gram	60
4.3.2. Mobilidade e coloração de flagelos	61
4.3.3. Coloração de cápsula	64
4.3.4. Coloração de contraste para esporos (negativo)	65
4.4. Aspectos culturais	68
4.5. Caracteres bioquímicos	71
4.5.1. Reação de catalase	73
4.5.2. Proliferação em anaerobiose	73
4.5.3. Reação de Voges-Proskauer	73
4.5.4. pH no meio de Clark e Lubs (reação de Voges-Proskauer - V.P.)	75
4.5.5. Temperaturas máxima e mínima de proliferação	75
4.5.6. Reação gema de ovo	77

4.5.7.	Proliferação em várias concentrações de cloreto de sódio (NaCl)	78
4.5.8.	Utilização de carboidratos	78
4.5.9.	Hidrólise do amido	79
4.5.10.	Proliferação em pH 5.7.	79
4.5.11.	Utilização do citrato	81
4.5.12.	Redução de nitrato a nitrito	81
4.5.13.	Hidrólise da caseína	82
4.5.14.	Hidrólise da tirosina	82
4.5.15.	Reação no leite tornassolado	82
4.5.16.	Hidrólise da gelatina	85
4.5.17.	Hidrólise da uréia	85
4.6.	Fórmulas dos meios de cultura empregados no isolamento e caracterização de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u>	89
4.6.1.	Ágar amido	89
4.6.2.	Ágar gema de ovo	89
4.6.3.	Ágar leite	90
4.6.4.	Ágar nutriente	90
4.6.5.	Ágar nutriente gelatina	90
4.6.6.	Ágar sangue	91
4.6.7.	Ágar semi-sólido	91
4.6.8.	Ágar simples	91
4.6.9.	Ágar tirosina	92
4.6.10.	Caldo citrato de Koser	92

	Página
4.6.11. Caldo gema de ovo	93
4.6.12. Caldo nitrado	93
4.6.13. Caldo Sabouraud dextrose	93
4.6.14. Caldo simples	94
4.6.15. "Fluid Thioglycollate Medium"	94
4.6.16. Leite simples	95
4.6.17. Leite tornassolado	95
4.6.18. Meio de Ayers <u>et alii</u> modificado	95
4.6.19. Meio de Clark e Lubs	96
4.6.20. Meio de Tarozzi	96
4.6.21. Uréia Stuart	97
4.7. Preparação do antígeno	97
4.7.1. Antígeno H ou flagelar	98
4.7.2. Antígeno O ou somático	99
4.7.3. Antígeno K ou capsular	100
4.7.4. Antígeno E ou esporos	101
4.7.5. Determinação da concentração dos antígenos	101
4.7.6. Mistura dos antígenos	102
4.8. Preparação do imunossoro	103
4.8.1. Imunização	103
4.8.2. Sangria de prova	104
4.8.3. Sangria definitiva	106
4.9. Diagnóstico de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> ..	107

4.9.1. Material de diagnóstico	107
4.9.2. Isolamento de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u>	109
4.9.3. Reação de aglutinação rápida em lâmina .	109
4.9.4. Teste de toxicidade da estirpe de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> isolada (processo toxi-infeccioso)	112
4.9.5. Reação de precipitação	114
4.9.5.1. Reação de precipitação em tubo do tipo reação de Ascoli	116
4.9.5.2. Reação de imunodifusão dupla radial (método de Ouchterlony) ..	118
5. RESULTADOS	122
6. DISCUSSÃO	124
7. CONCLUSÕES	132
8. SUMMARY	134
9. LITERATURA CITADA	136

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Propriedades da estirpe de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> estudada	87
2	Concentração das suspensões de antígenos de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u>	102
3	Título do soro anti- <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> , antes e após a liofilização	107
4	Distribuição do número de larvas de insetos examinadas, quanto à espécie, procedência e condição de letalidade	110
5	Diagnóstico do gênero <u>Bacillus</u> através de cultura "in vitro" e de <u>B. thuringiensis</u> através de aglutinação rápida em lâmina e de imunodifusão dupla radial	123

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	<u>B. thuringiensis</u> . Cultura com 24 horas em ágar simples. Escala 1:1.	59
2	<u>B. thuringiensis</u> . Coloração de Gram. Escala 3000:1	62
3	<u>B. thuringiensis</u> . Coloração de cílios, segundo o método de Gray. Escala 1875:1.	65
4	Cápsula de <u>B. thuringiensis</u> em esfregaço de hemo - linfa de <u>B. mori</u> infectada. Coloração de Gram . Escala 2250:1.	66
5	Cápsula de <u>B. thuringiensis</u> em esfregaço de uma cultura jovem. Coloração de Gram. Escala 2250:1. ...	66
6	<u>B. thuringiensis</u> . Coloração de Gram, com o cristal violeta a quente: a-bacilo com endosporo; b-forma vegetativa do bacilo; c- grupo de esporos; d- cristal com estrutura bi-piramidal, semelhante à da δ - endotoxina do <u>B. thuringiensis</u> . Escala 3000:1.	67
7	Microcolônia de <u>B. thuringiensis</u> ("Caput medusae"). Escala 90:1.	69

FIGURA

Página

8	Microcolônia de <u>B. thuringiensis</u> ("Caput medusae"). Escala 225:1.	69
9	Segmento do bordo de uma microcolônia de <u>B. thuringiensis</u> . Escala 900:1.	70
10	Cadeias de bacilos constituindo os filamentos de uma microcolônia de <u>B. thuringiensis</u> . Escala 1500:1	70
11	Hemólise produzida por colônias de <u>B. thuringiensis</u> em placa com ágar sangue. Entre elas, observa-se uma colônia de onde foi retirado inóculo para os testes de identificação. Escala 1:1.	72
12	Caracteres bioquímicos de <u>B. thuringiensis</u> : 1- reação positiva de catalase, com evidente liberação de oxigênio; 3- "Bacto-Fluid Thioglycollate Medium" se- meado; 5- meio de Tarozzi semeado mostrando intensa proliferação; 7- reação positiva de Voges-Proskauer (pH 6.9); 8- reação negativa de Voges-Proskauer (pH 4.3); 9- reação positiva de Voges-Proskauer (pH 5.6); 2,4,6 e 10- controles não semeados. Escala 1:2.5..	74
13	Caracteres bioquímicos de <u>B. thuringiensis</u> : 11- não proliferação em caldo simples, a 50°C; 12- prolifera	

	ção em caldo simples, a 10°C; 13- proliferação em caldo simples a 45°C; 14- não proliferação em cal do simples, a 50°C; 15- caldo gema de ovo semeado; 16- controle não semeado; 17- proliferação em cal do simples isento de NaCl; 18- proliferação em cal do simples com 5% de NaCl; 19- não proliferação em caldo simples com 7% de NaCl; 20- não prolife ração em caldo simples com 10% de NaCl. Escala 1:2.	76
14	Colônia de <u>B. thuringiensis</u> em ágar gema de ovo. Escala 1:1.	77
15	Caracteres bioquímicos de <u>B. thuringiensis</u> : 21- fermentação de glicose, com produção abundante de gás na base do tubo; 22,23,24- ausência de fer mentação, respectivamente, da arabinose, xilose e manitol; 25- fermentação do amido; 26- prolifera ção em pH 5.7; 28- proliferação em caldo citrato de Koser; 30- proliferação em caldo nitrado ; 27,29,31- controles não semeados. Escala 1:2.5. .	80
16	Colônias de <u>B. thuringiensis</u> em ágar amido: tes te positivo da hidrólise do referido carboidrato,	

FIGURA

Página

	com reativo de lugol. Escala 1:1.	81
17	Caracteres bioquímicos de <u>B. thuringiensis</u> : 32,34, 36- hidrólise da caseína, respectivamente, em leite simples, ágar leite e leite tornassolado; 38 - reação positiva de urease; 33,35,37,39- controles não semeados. Escala 1:1.5.....	83
18	Colônias de <u>B. thuringiensis</u> em ágar leite: hidrólise da caseína. Escala 1:1.	84
19	Colônias de <u>B. thuringiensis</u> em ágar tirosina: hidrólise do referido aminoácido. Escala 1:1.	84
20	Colônias de <u>B. thuringiensis</u> em ágar nutriente gelatina: teste positivo para hidrólise. Escala 1:1.	86
21	Esquema do processamento laboratorial para diagnóstico de <u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u>	108
22	Flora bacteriana resultante da semeadura do triturado de uma larva de inseto em ágar simples. As setas indicam colônias dotadas de caracteres morfológicos do <u>B. thuringiensis</u> . Escala 1:1.	111

FIGURA

Página

- 23 Reação de aglutinação rápida em lâmina: à direita, uma reação positiva para B. thuringiensis var. kurstaki; à esquerda, controle negativo. Escala 1.5:1. 112
- 24 Reação de precipitação em tubo: à esquerda, reação positiva para B. thuringiensis var. kurstaki; à direita, controle negativo. Escala 1.75:1. 117
- 25 Esquema representativo da disposição de um sistema antígeno-anticorpo, numa reação de imunodifusão dupla radial, para diagnóstico de B. thuringiensis var. kurstaki. Escala 2:1. ... 120
- 26 Reação sorológica de imunodifusão dupla radial : ab, ac, ae, af - linhas de precipitinas, indicando uma reação positiva de precipitação para B. thuringiensis var. kurstaki; ad - linha de precipitina correspondente ao controle positivo; ag - ausência de linha de precipitina, correspondente ao controle negativo. Escala 2:1. 121

1. RESUMO

A possibilidade de utilização das reações sorológicas foi investigada com o objetivo de tornar mais prático e específico o diagnóstico de Bacillus thuringiensis em larvas de insetos, sejam estas espécies úteis, vetores de doenças ou pragas, suscetíveis àquele microrganismo.

Um imunessoro foi obtido a partir de coelhos imunizados com os antígenos flagelar, somático, capsular e do esporo de uma estirpe de B. thuringiensis var. kurstaki (soro tipo III) isolada de uma formulação comercial deste inseticida biológico e caracterizada previamente.

No exame citobacterioscópico de culturas da referida estirpe, foi constatada a presença de formas vegetativas bacilares Gram-positivas, peritríquias e capsuladas. Através de um artifício utilizado na coloração de Gram, foram evidenciados esporos sub-terminais e isolados não corados, além de cristais dispersos, com estrutura bi-piramidal, semelhante

ã da δ - endotoxina do B. thuringiensis.

Quanto ao aspecto cultural, a bactéria em questão proliferou em ágar simples com o aspecto de colônias rugosas, de bordo irregular e tendendo a formar um véu tipo pseudopodo. As colônias de B. thuringiensis apresentaram, em ágar sangue, um evidente halo de hemólise ao seu redor.

A série bioquímica, convencionalmente empregada para a identificação de B. thuringiensis, foi complementada com uma prova de hidrólise da uréia, utilizando o meio de Ureia Stuart.

O diagnóstico de B. thuringiensis através de reação de aglutinação rápida em lâmina e de reação de imunodifusão dupla radial em placa foi realizado em 155 larvas de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, constatando-se a ocorrência de bactérias morfologicamente pertencentes ao gênero Bacillus em 3.8% dos casos e a incidência de B. thuringiensis em 34.8% dos materiais examinados.

A eficiência das reações sorológicas utilizadas foi comprovada pela determinação qualitativa da toxicidade das estirpes de B. thuringiensis isoladas.

Os resultados obtidos permitiram concluir que :

- 1 - há possibilidade de empregar reações sorológicas específicas no diagnóstico de B. thuringiensis em larvas de insetos ;
- 2 - a reação sorológica de aglutinação rápida em lâmina é acon

selhável apenas para um diagnóstico rápido de triagem do B. thuringiensis; 3 - a reação sorológica de imunodifusão dupla radial em placa fornece resultados de diagnóstico do B. thuringiensis, mais rápidos, mais específicos e de menor custo em relação à identificação bioquímica; 4 - as reações sorológicas para diagnóstico do B. thuringiensis devem ser executadas com um imunossoro obtido contra um ou mais antígenos de maior especificidade que o antígeno flagelar.

2. INTRODUÇÃO

A eficiência de Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 como um inseticida e seu subsequente sucesso comercial têm encorajado os pesquisadores a evidenciar tal bactéria como agente patogênico em outras pragas e vetores de doenças do homem e outros animais.

Conquanto sejam numerosos os seus méritos, merece menção um aspecto negativo do controle biológico com B. thuringiensis, qual seja, a toxicidade de certas variedades deste microrganismo em relação à abelha (Apis mellifera L. (Hymenoptera, Apidae)) e ao bicho-da-seda (Bombyx mori (L.) (Lepidoptera, Bombycidae)), como foi demonstrado, respectivamente, por KRIEG e HERFS (1963) e BURGERJON e DE BARJAC (1960). Esta característica, aliada a uma deriva accidental da pulverização do bioinseticida, implica na possível necessidade futura de se diagnosticar B. thuringiensis como patógeno responsável pela morte destas espécies de insetos úteis.

A identificação de B. thuringiensis é baseada

comumente na investigação de caracteres fisiológicos e bioquímicos mais ou menos complexos e que fornece resultados demorados e inespecíficos.

Considerando que tal bactéria é um membro do grupo do Bacillus cereus, intimamente relacionado com Bacillus anthracis Cohn, 1972, agente causador do carbúnculo hemático dos bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos, em cujo diagnóstico tem grande importância um teste sorológico (reação de Ascoli), mais específico e prático que os métodos de diagnóstico convencionalmente empregados, constituiu objetivo da presente tese o diagnóstico de B. thuringiensis em larvas de insetos através de dois tipos de reações sorológicas: reação de aglutinação rápida em lâmina e reação de imunodifusão dupla radial em placa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Introdução

A bactéria esporulada Bacillus thuringiensis foi isolada e descrita por BERLINER (1915), a partir de larvas doentes de Anagasta kuehniella (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) , na província alemã de Thuringia, de onde se originou o seu nome.

A estirpe original foi perdida, mas doze anos mais tarde, MATTES (1927) reisolou o mesmo organismo e descreveu a doença por ele causada em A. kuehniella.

Posteriormente, ao levantar a questão da patogenicidade das bactérias esporuladas para insetos, STEINHAUS (1951) constatou que a cepa de MATTES ainda conservava sua virulência.

Referida como Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner, de acordo com HEIMPEL (1967a), essa mesma estirpe foi a base das primeiras preparações comerciais produzidas nos Estado Unidos e em diversas regiões da Europa, segundo

BRIGGS (1963).

3.2. Taxonomia

Antes de 1946, a diferenciação das espécies do gênero Bacillus e a identificação de muitos dos seus membros era extremamente difícil. Esta situação mudou com a publicação da chave determinativa de SMITH et alii (1946), subsequentemente ampliada em 1952, onde os autores consideram B. thuringiensis como uma variedade de B. cereus, devido à sua semelhança com a espécie parental.

TOUMANOFF (1952) propôs uma designação semelhante: a de Bacillus cereus var. sotto e a de Bacillus cereus var. thuringiensis a duas cepas de patógenos de insetos, semelhantes sob o ponto de vista bioquímico.

DELAPORTE e BEGUIN (1955) examinaram diversas estirpes de bactérias cristalíferas, concluindo que B. sotto, B. cereus var. alesti, B. thuringiensis e a cepa "Anduze" eram variedades de B. thuringiensis Berliner. Arguindo que há diferenças entre B. cereus e os outros patógenos de insetos, a mais importante sendo a produção de cristais, eles propuseram a manutenção de B. thuringiensis como a espécie "parental" dos patógenos de insetos semelhantes ao B. cereus, apesar de sotto ser um nome mais antigo que thuringiensis.

HEIMPEL e ANGUS (1958a), comparando as caracterís

ticas de sete espécies cristalíferas de Bacillus, constataram que a presença do cristal era um caráter estável que permitia a diferenciação entre um patógeno de inseto e as estirpes não patogênicas mas semelhantes de B. cereus. Conseqüentemente, designaram Bacillus thuringiensis Berliner como a espécie tipo e apresentaram uma chave de identificação para as espécies pertencentes ao "grupo do B. cereus", onde sotto, alesti e thuringiensis foram propostas como variedades da mesma espécie.

Esta opinião foi contestada por TOUMANOFF e LE COROLLER (1959), os quais insistiram em que as bactérias cristalíferas eram variedades de Bacillus cereus Frankland and Frankland, e publicaram um esquema alternativo para a taxonomia do "grupo do B. cereus", dividindo-o em dois grupos, o dos "acristalíferos" e o dos "cristalíferos".

DE BARJAC e BONNEFOI (1962), bem como BONNEFOI e DE BARJAC (1963), propuseram, pela primeira vez, uma base bioquímica-sorológica para a classificação de estirpes de B. thuringiensis, após estudá-las através de seus caracteres culturais e bioquímicos e da reação de aglutinação flagelar. Os grupos sorológicos coincidiram exatamente com os grupos bioquímicos, permitindo-lhes identificar nove sorotipos diferentes.

Para LYSENKO (1963), a formação de cristais não

pode ser considerada um caráter distintivo básico ou um caráter importante ou constante. Ao comparar o grupo inteiro do B. cereus através de vários métodos, exceto por sua patogenicidade, por exemplo, ao bicho-da-seda (Bombyx mori) e pela presença ou ausência de um cristal, LYSENKO encontrou uma grande semelhança (95 a 100%); entretanto, B. thuringiensis mata o bicho-da-seda e outros lepidópteros; e B. cereus não. Comparados pela patogenicidade e presença de um cristal, B. cereus e B. thuringiensis são polos opostos.

NORRIS e BURGESS (1963) e NORRIS (1964) submeteram 46 estirpes de bactérias cristalíferas à análise eletroforética das diversas formas moleculares de esterase presentes em extratos de células vegetativas. Os 9 padrões observados correspondem rigorosamente aos grupos sorológicos obtidos por meio de análise do antígeno H, com pequenas exceções. Posteriormente, NORRIS e BURGESS (1965) publicaram um trabalho sobre a identificação de B. thuringiensis, onde eles sugerem o emprego da análise das esterases como base para estudos taxonômicos posteriores.

KRYWIENCZYK e ANGUS (1967) compararam, através de métodos sorológicos, a proteína tóxica das inclusões parasporais produzidas por diversas variedades de B. thuringiensis e sugeriram que são possíveis discriminações mais sutis.

HEIMPEL (1967b) incorporou a maior parte dos conceitos elaborados até a época na atualização de uma chave de

identificação das bactérias cristalíferas, originalmente publicada em 1958. A alteração mais séria foi a eliminação de B. entomocidus como espécie. As variedades envolvidas passaram a ser designadas como B. thuringiensis var. entomocidus e B. thuringiensis var. subtoxicus.

A toxicidade, incluindo tanto a toxina cristalina como a β -exotoxina, foi proposta como um critério de classificação por HEIMPEL (1967a), mas esta última propriedade foi questionada por causa da resposta variável mostrada nas interações hospedeiro-patógeno e por causa da dificuldade nos testes de padronização.

WOLF e BARKER (1968) publicaram um trabalho onde são discutidas as dificuldades da identificação das espécies do gênero Bacillus e onde incluíram uma tabela que distingue claramente os vários tipos de B. thuringiensis reconhecidos até então.

DE BARJAC e BONNEFOI (1968) estabeleceram as variedades tipos, cuja utilidade na classificação de novos isolamentos já havia sido demonstrada por BUCHER et alii (1966).

KRIEG et alii (1968) isolaram na Alemanha, a partir de larvas de Galleria mellonella (Lepidoptera, Pyralidae), o sorotipo H-10 representado por B. thuringiensis var. darms-tadiensis. Tal organismo produz tanto um cristal parasporal como uma exotoxina termoestável solúvel, ambos com poder inseticida

KRIEG (1969) isolou a estirpe B30-2 de B. thuringiensis var. toumanoffii, cujo esporângio contém, além do esporo, um cristal parasporal com forma de diamante. A célula vegetativa produz exotoxina e a estirpe representa um novo sorotipo: H-11.

DE BARJAC e THOMPSON (1970) isolaram de Galleria mellonella o sorotipo H-12, representado por B. thuringiensis var. thompsoni, que produz acetilmetilcarbinol e lecitinase, mas nenhuma exotoxina termoestável. Ele comumente produz um esporo e um cristal parasporal tóxico em 24 a 48 horas a 30°C.

DE BARJAC e LEMILLE (1970) fizeram um estudo de cinco estirpes pertencentes ao sorotipo 3 de B. thuringiensis, demonstrando a presença de subfatores antigênicos flagelares. Assim sendo, o antígeno H₃ foi subdividido, passando a ter a seguinte fórmula antigênica: H₃: 3a para B. thuringiensis var. a1esti e H₃: 3a3b para B. thuringiensis var. kurstaki.

Na monografia de GORDON et alii (1973), a localização de B. thuringiensis dentro do gênero Bacillus é baseada em características morfológicas e fisiológicas comumente usadas para o gênero. Os autores não consideram a patogenicidade e a toxina cristalina como bases para a especiação porque a inclusão cristalina não está invariavelmente presente nas estirpes de B. thuringiensis de todas as coleções. Em consequência, estes autores consideram B. thuringiensis uma variedade

de B. cereus, em companhia de B. anthracis e B. mycoides. As semelhanças entre B. cereus e B. thuringiensis incluem um "exosporium" característico, um antígeno de esporo comum, e suscetibilidade cruzada a alguns bacteriófagos, mas há algumas diferenças bioquímicas - capacidade de utilização de citrato, presença de lecitinase e produção de acetilmetilcarbinol - embora elas sejam variáveis em um ou outro organismo e sua utilidade para a designação das espécies possa logicamente ser questionada.

Em contraste, BUCHANAN e GIBBONS (1974), na oitava edição de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, reconhecem a individualidade de B. thuringiensis como uma espécie separada de B. cereus. Sua posição é baseada primariamente na presença do corpo parasporal (toxina cristalina) e na patogenicidade para certos insetos. Na natureza, estas características estão intimamente relacionadas porque a patogenicidade está comumente associada à invasão ocasionada pela ação do cristal ao alterar a integridade da parede intestinal do inseto.

A subespécie correspondente ao sorotipo 13 , B. thuringiensis var. pakistani, foi isolada por DE BARJAC et alii (1977). Posteriormente, uma variedade muito tóxica para mosquitos, B. thuringiensis var. israelensis, sorotipo 14 , foi isolada por DE BARJAC (1978).

KRYWIENCZYK et alii (1978) identificaram, com base na sorologia do cristal, dois grupos distintos dentro de B. thuringiensis var. kurstaki (sorotipo 3ab), cuja toxicidade

também difere. O sorotipo 3ab foi separado em dois subgrupos designados K-1 e K-73.

Desta maneira, a espécie B. thuringiensis está diferenciada, atualmente, nos sorotipos expressos a seguir:

Sorotipo	Variedade
1	<u>thuringiensis</u> ; <u>amuscatoxicus</u>
2	<u>finitimus</u>
3	<u>alesti</u>
3	<u>kurstaki</u>
4	<u>sotto</u> ; <u>dendrolimus</u>
4	<u>kenyae</u>
5	<u>galleriae</u>
6	<u>entomocidus</u> ; <u>subtoxicus</u>
7	<u>aizawai</u> ; <u>pacificus</u>
8	<u>anagastae</u>
9	<u>tolworthi</u>
10	<u>darmstadiensis</u>
11	<u>toumanoffii</u>
12	<u>thompsoni</u>
13	<u>pakistani</u>
14	<u>israelensis</u>

3.3. Propriedades morfológicas e bioquímicas

GORDON et alii (1973) descreveram a espécie

B. thuringiensis, baseados no exame de 15 estirpes de sua coleção, cujas propriedades estão sumarizadas a seguir:

Propriedade	<u>B. thuringiensis</u>
-------------	-------------------------

Bacilos:

Largura, μ	1.0 - 1.2
Comprimento, μ	3 - 5
Reação de Gram	+
Glóbulos não corados no protoplasma ..	+

Esporos:

Elipsoidal	+
Circular	-
Central ou paracentral	+
Distendendo o esporângio	-
Corpos parasporais cristalinos	a
Motilidade	a
Catalase	+
Proliferação anaeróbica	+
Reação V-P	+
pH em caldo V-P	4.3 - 5.6

Temperatura de proliferação, °C:

Máxima	40 - 45
Mínima	10 - 15
Reação gema de ovo	+

Propriedade	<u>B. thuringiensis</u>
-------------	-------------------------

Proliferação em:

Lisozima (0.001 por cento)	+
NaCl (7%)	+
Meio , pH 5.7	+

Ácido de:

Glicose	+
Arabinose	-
Xilose	-
Manitol	-
Hidrólise de amido	+
Uso de citrato	+
Redução de NO_3 a NO_2	+
Desaminação da fenilalanina , 1 semana	-

Decomposição de:

Caseína	+
Tirosina	+

Porcentagem de estirpes que apresentaram a característica:

+, 85-100; a, 50-84; -, 0-14.

3.4. Fisiologia

3.4.1. Exigências nutricionais

B. thuringiensis é um patógeno não obrigatório.

Ele pode ocorrer na natureza independentemente do hospedeiro (a maior parte dos isolamentos ocorreu, entretanto, a partir de insetos doentes) e é facilmente cultivado em meio artificial.

As exigências nutricionais de B. thuringiensis foram estudadas por NICKERSON e BULLA (1974) numa tentativa de delinear os mecanismos reguladores da esporulação e formação do cristal parasporal. Os autores desenvolveram um meio sintético definido que promove a proliferação abundante e esporulação de uma grande variedade de estirpes de B. thuringiensis. Quando cultivados nesse meio básico, todos os 12 sorotipos identificados exibem uma exigência auxotrófica de ácido glutâmico, ácido aspártico e ácido cítrico.

Outros meios foram formulados por SINGER et alii (1966) e por CONNER e HANSEN (1967), porém permitem apenas uma proliferação mínima e escassa esporulação de algumas estirpes.

O argumento de que B. thuringiensis desenvolve em meios com traços de sais e de glicose (SINGER et alii, 1966; ROGOFF e YOUSTEN, 1969) é considerado errôneo porque os sais utilizados nestes meios são sais orgânicos que poderiam ser responsáveis pela proliferação observada.

Nem o succinato nem o fumarato podem substituir o glutamato, aspartato e citrato, mas, segundo NICKERSON

et alii (1974a), a exigência destes compostos não é resultante de falhas no catabolismo da glicose ou no ciclo do ácido tri-carboxílico, nem uma manifestação de uma exigência vitamínica não satisfeita. A necessidade destes ácidos orgânicos pode ser suprida se o meio básico for suplementado com cistina, tio sulfato ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A função fisiológica destes diversos compostos não está clara, mas o citrato e o EDTA são reguladores positivos da síntese de ácidos graxos (MARTIN e VAGELOS, 1962; WAITE e WAKIL, 1962; WAKIL et alii, 1966; REEVES et alii, 1967) e a cistina controla a síntese da membrana (TOENNIES, 1965). Talvez B. thuringiensis exija um estimulador da síntese de ácidos graxos para crescer, esporular e formar cristais parasporais.

3.4.2. Propriedades metabólicas

B. thuringiensis utiliza carboidratos para a produção de energia durante o crescimento vegetativo. A glicose é catabolizada completamente até gás carbônico.

As vias metabólicas primárias no B. thuringiensis são semelhantes às de outros bacilos onde o EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) é o mecanismo primário de assimilação da glicose, enquanto que a via PP (pentose-fosfato), fornecendo fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido, auxilia mais a formação de intermediários biosintéticos do que funciona como uma via respiratória importante.

Segundo YOUSTEN e ROGOFF (1969), a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, comumente associada à capacidade de esporulação, é característica das células de B. thuringiensis em fase de transição para a esporulação. Embora o acetato de flúor, um inibidor da hidratase aconitato, iniba efetivamente a oxidação de acetato, e formação do esporo e cristal parasporal, não há certeza se esta inibição da atividade do ciclo tricarboxílico impede absolutamente a esporulação.

YOUSTEN e HANSON (1972) demonstraram que o ciclo do ácido tricarboxílico não constitui uma necessidade absoluta para a esporulação, ao obter mutantes esporulados de B. subtilis com falhas no ciclo.

Posteriormente, NICKERSON et alii (1974b) induziram esporulação em células de B. thuringiensis com deficiências no ciclo do ácido tricarboxílico. Os esporos foram produzidos num meio com uma concentração extremamente baixa de glutamato e eram: (a) refráteis, (b) resistentes ao octanol, (c) resistentes a 62°C por 1 hora, (d) não corados por corantes específicos de gordura e grânulos metacromáticos, (e) sensíveis ao tratamento pelo calor (80°C por 30 min.), (f) de conteúdo reduzido de ácido dipicolínico, e (g) de densidade diminuída.

3.4.3. Toxinas produzidas

Um conhecimento preciso dos recursos utilizados por um patógeno para invadir e dominar o hospedeiro é um pré-

requisito para a produção efetiva, armazenamento e uso de um patógeno no controle microbiano. Este fato tem conduzido a intensas pesquisas sobre o modo de ação de B. thuringiensis (B. t.) e suas variedades.

Até o momento, quatro entidades tóxicas separadas foram isoladas ou detectadas em culturas de bactérias cristalíferas. HEIMPEL (1967a) propôs o seguinte esquema de nomenclatura para tais toxinas:

<u>B. t.</u>	α - exotoxina	Lecitinase C; fosfolipase C.
<u>B. t.</u>	β - exotoxina	Toxina termoestável ativa <u>per os</u> ; a exotoxina; toxina da mosca; toxina termoestável da mosca; a toxina termoestável; a exotoxina termoestável.
<u>B. t.</u>	γ - exotoxina	A(s) enzima(s) não identificada(s) responsável(is) pelo clareamento do agar gema de ovo.
<u>B. t.</u>	δ - endotoxina	O cristal; o cristal proteínico; o corpo parasporal cristalino.

3.4.3.1. B. t. α - exotoxina

Conhecida também como fosfolipase C ou lecitinase C, foi detectada por TOUMANOFF (1953) ao estudar a sua produção por vários membros do gênero Bacillus. Ele confirmou

a afirmativa original de COLMER (1948) de que apenas as bactérias do "grupo do B. cereus" produzem fosfolipase C e concluiu que a produção de lecitinase deveria desempenhar uma função no efeito tóxico destes bacilos do grupo cereus sobre os insetos.

Posteriormente, TOUMANOFF (1954) observou que os filtrados das culturas em caldo de B. thuringiensis var. alesti eram praticamente inócuos por injeção em larva de Galleria mellonella e eram inofensivos quando administrados per os. Entretanto, ao precipitar as proteínas dos filtrados através do método de CHU (1949) com sulfato de amônio (concentrando, assim, a fosfolipase C), ele constatou que o precipitado era tóxico tanto por injeção como per os. O autor concluiu que a fosfolipase C contribui parcialmente para a ação tóxica de B. thuringiensis var. alesti.

Na mesma época, HEIMPEL (1955a,b) demonstrou que as estirpes de B. cereus, que produziam quantidades relativamente grandes de fosfolipase C, eram mais virulentas para Pristiphora erichsonii (Hymenoptera, Tenthredinidae) do que as estirpes que produziam quantidades menores. Estes experimentos foram confirmados por KUSHNER e HEIMPEL (1957). Outras espécies do gênero Bacillus, que não produziam esta lecitinase, não se mostraram virulentas para este inseto.

HEIMPEL (1955b) demonstrou que B. thuringiensis produzia fosfolipase em quantidades relativas aproximadamente iguais às das estirpes patogênicas de B. cereus, e posterior-

mente afirmou que todas as bactérias cristalíferas (com exceção das variedades entomocidus e subtoxicus de B. thuringiensis) produzem fosfolipase C em quantidades relativamente altas. Ele demonstrou que Pristiphora erichsonii tem um pH relativamente baixo no intestino médio (pH 7.0 a 8.4), que não apenas permite um bom desenvolvimento de B. cereus mas está bem dentro dos limites de pH (6.8 a 7.4) para atividade da fosfolipase. O autor salientou que a maioria dos lepidópteros é imune ao B. cereus por causa do alto pH do intestino médio que restringe a proliferação, mas também enfatizou que o "stress" sob a forma de inanição abaixa o pH, permitindo boa proliferação de B. cereus ou de bacilos vegetativos cristalíferos e produção subsequente de fosfolipase C. Um trabalho de BONNEFOI e BÉGUIN (1959) confirmou estes resultados.

3.4.3.2. B.t. β - exotoxina

MC CONNELL e RICHARDS (1959) demonstraram a produção desta substância tóxica em culturas in vitro e in vivo de B. thuringiensis var. thuringiensis. A substância detectável após 24 horas de incubação, é hidrosolúvel e dializável, mas não é tóxica para os insetos testados per os. Para matar, o material deve ser injetado e exige 4 dias ou mais para causar a morte. Os autores demonstraram que uma estirpe de B. cereus, considerada não patogênica para insetos produzia um material tóxico semelhante mas aparentemente em concentração menor. Eles concluíram que a toxina termoestável deve desempenhar apenas um

papel secundário na doença dos insetos já que é produzida também por um "não patógeno". Entretanto, algumas estirpes de B. cereus são patogênicas para diversos insetos.

A B.t. β - exotoxina tem um espectro de ação mais amplo do que a B.t. δ - endotoxina, já que é eficaz contra larvas de insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera e Orthoptera.

De acordo com BURGERJON (1965), a β - exotoxina afeta os insetos apenas na ecdise ou durante a metamorfose e pode causar a morte durante a ecdise, impedir a pupação ou causar envenenamento crônico nos adultos. A dose de B.t. β - exotoxina necessária para matar os insetos é extraordinariamente baixa, mesmo quando o material está apenas semipurificado (DE BARJAC e DEDONDER, 1965), o que sugere que a toxina pode agir a nível molecular.

DE BARJAC e DEDONDER (1965) isolaram a B.t. β - exotoxina através de adsorção em carvão e cromatografia de papel. Os autores descreveram o comportamento da exotoxina em diversos sistemas de solventes e em eletroforese de papel. A clivagem hidrolítica dessa espécie de exotoxina indicou uma proporção de 1:1:1 de adenina, ribose e fósforo. Num trabalho posterior, DE BARJAC e DEDONDER (1968) relataram o espectro ultravioleta, o peso molecular aproximado (700-800) e a presença de dois sistemas cis diol na molécula de exotoxina. Segundo BOND et alii (1969), a β - exotoxina contém um derivado

de adenosina ligado através da glicose à posição 5' do ácido fosfoalárico.

Usando Escherichia coli, SEBESTA e HORSKA (1968) observaram que a β - exotoxina inibia a polimerase do ácido ribonucleico (RNA) dependente do ácido desoxiribonucleico (DNA). Além disso, a inibição competia com o trifosfato de adenosina (ATP) já que os autores obtiveram reversão da inibição pela adição de ATP mas não pela adição de outros trifosfatos de ribonucleotídeos. Assim, a inibição depende da relação molecular entre ATP e a β - exotoxina. Aparentemente, a polimerase prefere a β - exotoxina ao ATP. Eles observaram também que a inibição ocorre indiferentemente à adição da β - exotoxina, antes ou após o início da polimerização. A injeção de β - exotoxina em larvas de Tenebrio molitor (Coleoptera, Tenebrionidae) resultou na inibição da síntese de RNA. Suas conclusões foram de que a β - exotoxina inibe a polimerização. Desse modo, em geral, a β - exotoxina inibe as enzimas envolvidas com substratos nucleotídicos, tais como RNA nucleotidas e polimerases dependentes do DNA envolvidas com ATP. Assim, a β - exotoxina é um metabólico tóxico.

A inibição competitiva da RNA polimerase em E. coli e em células de mamíferos pela B.t. β - exotoxina foi confirmada em trabalhos posteriores de SEBESTA e HORSKA (1970) e de BEEBEE et alii (1972).

3.4.3.3. B.t. γ - exotoxina

As variedades entomocidus e subtoxicus de B. th

ringiensis não produzem fosfolipase; entretanto, elas têm uma ação não esclarecida sobre os fosfolípidos, resultando numa hidrólise em placas de ágar gema de ovo e num clareamento imediato resultante ao redor das colônias destas bactérias.

A B.t. γ - exotoxina é uma enzima não identificada, para a qual não foi obtida nenhuma prova de toxicidade e cuja natureza precisa não foi ainda determinada.

3.4.3.4. B.t. δ - endotoxina

3.4.3.4.1. Introdução

A capacidade de produzir um ou mais cristais de proteína por célula é o principal caráter que separa os membros do grupo do Bacillus thuringiensis do intimamente semelhante, mas não entomopatogênico, Bacillus cereus.

ANGUS (1954) descreveu um princípio tóxico presente apenas em culturas esporuladas de B. thuringiensis var. sotto e que causava a paralisia do intestino, seguida de paralisia geral, em larvas de bicho-da-seda, 60 a 80 minutos após a ingestão. Estudos subsequentes mostraram que, na maioria dos lepidópteros suscetíveis, ocorre paralisia do intestino. Ele demonstrou que o princípio era alcalino-solúvel e, após HANNAY (1953) ter descoberto o cristal em cada célula esporulada, ANGUS também demonstrou que o cristal era a entidade alcalino-solúvel que continha a toxina. Estudos posteriores provaram que muitas es

pêcies da ordem Lepidoptera são suscetíveis a esta toxina alcalino-solúvel. Semelhantemente, FITZ JAMES et alii (1958) e HEIMPEL e ANGUS (1958b) demonstraram que os cristais de outras variedades contêm B.t. δ - endotoxina.

ANGUS (1954) demonstrou que o cristal isolado afetava o bicho-da-seda e que nem o cristal nem a solução alcalina do cristal afetavam o inseto quando injetados na hemocoele. Entretanto, muitos insetos são mortos pela injeção de esporos lavados de B. thuringiensis na hemocoele.

3.4.3.4.2. Biosíntese do cristal proteico

Segundo HEIMPEL e ANGUS (1960), o tratamento rigoroso da bactéria pode causar a perda de habilidade para formar um corpo parasporal, fazendo-os sugerir que a produção de cristal poderia estar sob controle genético. Subculturas de B. thuringiensis var. sotto, em posse dos autores há 45 anos, produziam cristais invariavelmente após incubação em ágar simples a 33°C. Tal cultivo, assim prolongado, em condições saprofíticas, sem contacto com um inseto, deveria ter um efeito degenerativo sobre a habilidade em formar cristais, se esta habilidade tivesse valor seletivo no inseto. Como o cristal é uma proteína desprovida de conteúdo fosfórico (ANGUS, 1956a), os autores consideraram improvável que o cristal fosse um esporo abortado. De acordo com uma interessante teoria, o cristal seria uma substância indesejável produzida como um produto meta

bólico da esporulação e que seria removido por cristalização . Isto poderia explicar a inércia química relativamente grande do cristal.

YOUNG e FITZ-JAMES (1959a) demonstraram que, num bacilo, o alongamento dos dois corpúsculos de cromatina, formando uma estrutura filamentosa ao longo do eixo, é uma evidência citológica segura da passagem da forma vegetativa para célula em esporulação. Neste ponto, cessam o crescimento e a síntese de ácido nucleico. Antes deste estágio ser atingido, a adição de 8 - azaguanina inibe a esporulação e, em consequência, a formação de cristal. A adição do análogo após este estágio não inibe a formação do cristal.

O primeiro estudo detalhado das alterações que ocorrem durante a formação do esporo e do cristal foi feito por YOUNG e FITZ-JAMES (1959b). O material cromatínico se forma num filamento axial que fica parcialmente envolvido no pré-esporo por uma invaginação da membrana citoplasmática. O envolvimento do pré-esporo pela membrana invaginada ocorre de modo usual e é seguido pela formação da cortex e da parede do esporo. O primeiro sinal de formação do cristal, o aparecimento de um pequeno grânulo refrátil, é visto num estágio inicial da formação do esporo e o primeiro sinal de material do cristal aparece logo após a membrana citoplasmática ter completado o envolvimento do pré-esporo.

MONRO (1961) demonstrou que toda a proteína do

cristal é manufaturada a partir de aminoácidos resultantes da hidrólise da proteína intracelular durante um movimento proteico relativamente maciço que ocorre na célula, neste estágio de desenvolvimento. Ele concluiu que estas inclusões tóxicas não são formadas por simples cristalização da proteína que existe nas células vegetativas antes da esporulação.

Na maioria das variedades de B. thuringiensis, a formação do esporo e do cristal é seguida pela lise dos vestígios da parede do esporângio, liberando o esporo e o cristal separadamente dentro do meio de cultura (NORRIS e WATSON, 1960). Diversos estudos têm confirmado que o cristal está fora do delicado "exosporium" que envolve o próprio esporo. Com um organismo, entretanto, B. thuringiensis var. finitimus (sorotipo II), a situação é diferente; o esporo e o cristal não se separam um do outro e são liberados a partir do esporângio desintegrado como uma entidade única. Nesta bactéria, o cristal se forma dentro do "exosporium" e esta membrana permanece intacta após a liberação do complexo esporo/cristal.

YOUNG e FITZ-JAMES (1959b), como resultado de seus estudos com B. thuringiensis var. alesti, demonstraram que o cristal é sintetizado a partir de compostos de baixo peso molecular numa proteína que passa por um processo de "maturação", o qual é acompanhado por alterações na solubilidade devidas à formação de pontes S-S. A inércia incomum dos cristais tem sido atribuída a estas pontes S-S.

Ao invés disso, FAUST e ESTES (1966) propuseram que os cristais parasporais têm uma subestrutura de silício e que sua inércia e propriedades incomuns de solubilidade podem ser devidas mais a pontes Si-proteína do que a pontes S-S. Usando uma nova modificação do método colorimétrico para detectar silício (ESTES e FAUST, 1965), eles demonstraram que os cristais de B. thuringiensis var. anagastae e var. pacificus e de B. finitimus var. finitimus continham 0.35, 0.30 e 0.43 % de silício, respectivamente, em relação ao peso seco de preparações de cristais puros. Os autores argüíram que, enquanto a hipótese de pontes S-S poderia ser uma explicação razoável para a inércia química da lâ (9-12% de cistina), parece improvável que o conteúdo de 1.1% de cistina pudesse contribuir com o número de pontes S-S necessárias para formar um material cristalino quimicamente inerte como o corpo parasporal. Eles também observaram que os cristais contêm menos cistina do que as proteínas solúveis tais como as albuminas (0.5% de cistina), corroborando também a idéia de que as pontes S-S não são as ligações estruturais principais envolvidas neste caso.

O mecanismo de transporte de silício nas bactérias foi descrito por HEINEN (1965). Segundo ele, o silício presente no interior da célula na fase de esporulação, absorveria a proteína tóxica assim que ela fosse formada, o que pode indicar que a proteína é isolada da solução para proteger a célula. Tentativas para testar esta hipótese, cultivando

B. thuringiensis em meios isentos de silício, fracassaram porque a bactéria não foi induzida a esporular na ausência de silício e nem a proteína tóxica foi formada.

Diversos pesquisadores estudaram a formação do cristal, sugerindo que o cristal proteico se desenvolve em associação com o "exosporium" do pré-esporo em desenvolvimento. GERHARDT e RIBI (1964) demonstraram que o "exosporium" tem uma estrutura complexa com um grau de regularidade cristalina na membrana basal. DELAFIELD et alii (1968) e SOMERVILLE et alii (1968) provaram que a proteína do cristal é muito semelhante em natureza química e também compartilha determinantes antigênicos com a proteína da capa do esporo.

ARONSON (1965) observou que uma fração substancial do RNA nas células em esporulação está ligada à membrana e sugeriu que este RNA pode ser um mensageiro estável para a síntese da capa do esporo. Estas várias observações podem significar que o "exosporium" desempenha um importante papel na síntese da capa do esporo e que os cristais de B. thuringiensis surgem em consequência de um desarranjo no processo normal que regula a síntese dos componentes do esporo.

3.4.3.4.3. Estrutura do cristal

O cristal tóxico de B. thuringiensis é comumente um octaedro com uma forma tetragonal; entretanto, STEINHAUS e JERREL (1954) e TOUMANOFF e LE COROLLER (1959) constataram ou-

tras formas de cristais, variando de triangular a cubóide.

As investigações de YOUNG e FITZ-JAMES (1959b) e MONRO (1961) confirmaram que as inclusões cristalinas aparecem durante uma fase definida do processo de esporulação e não têm apenas uma forma regular, mas também uma estrutura superficial finamente estriada. Nos estágios iniciais de formação, elas mostram rudimentos da forma e da estrutura superficial finais.

O trabalho de LABAW (1964) com B. thuringiensis var. thuringiensis Berliner revelou a estrutura dos cristais proteicos como sendo uma célula unitária cúbica face-centrada (fcc) tetramolecular com 123 Å de aresta. As moléculas de proteína parecem ser esféricas, com um diâmetro de 87 Å. De acordo com o autor, a forma bi-piramidal destes cristais resulta do fato deles estarem ligados por oito faces semelhantes, nas quais as fileiras de moléculas estão separadas por três diâmetros. LABAW também descobriu que os fragmentos de membrana eram constituídos por arranjos hexagonais de esferas ou elipsóides, cuja separação média centro-a-centro era 68 Å; eram comuns nas preparações examinadas e eram considerados como sendo um componente das paredes celulares.

GRIGOROVA et alii (1967) descreveram dois tipos de cristais (bipiramidal e biprismático) e, baseados nas medidas de vários cristais, sugeriram que as moléculas que constituem ambos os tipos têm a forma de um elipsóide rotativo.

3.4.3.4.4. Sorologia da proteína do cristal

DE BARJAC e LECADET (1961) sugeriram que, quando a proteína do cristal álcali-dissolvida era usada para imunizar coelhos, o antissoro reagia com a proteína solúvel, dando um número grande de linhas de precipitação.

PENDLETON e MORRISON (1966) encontraram, por es tirpe, apenas uma linha principal de precipitação do cristal dissolvido frente ao antissoro homólogo. Eles concluíram que os grupos de B. thuringiensis distinguíveis através dos antígenos flagelares e esterases das células vegetativas, poderiam ser também subdivididos com base nos antígenos do cristal.

KRYWIENCZYK e ANGUS (1967), por outro lado, obser varam cinco linhas de precipitinas quando a proteína solúvel do cristal foi colocada frente ao antissoro homólogo. Quando fo ram usados antissoros heterólogos, um número menor de linhas de precipitinas foi encontrado. Por exemplo, a proteína solúvel de B. thuringiensis var. sotto frente ao antissoro homólogo forneceu cinco linhas, enquanto que quando foi usado o antissoro contra a proteína do cristal de B. thuringiensis var. thuringiensis (Berliner), apenas dois antígenos foram detectados.

COOKSEY (1968) encontrou dois antígenos principais em B. thuringiensis, quando a proteína dissolvida foi co-

locada frente ao antissoro homólogo. Havia outra linha tênue nos testes de difusão dupla de Ouchterlony, que não era sempre vista. Entretanto, em certas ocasiões, observou-se que as duas linhas simples eram duplas e muito próximas umas das outras, perfazendo, ao todo, cinco linhas. O autor demonstrou também que havia uma relação quantitativa entre a concentração de um determinado antígeno numa preparação de cristal dissolvido de B. thuringiensis e as propriedades tóxicas da mesma preparação.

A proteína da capa do esporo e o cristal são imunológica e bioquimicamente semelhantes, como foi evidenciado por DELAFIELD et alii (1968), SOMERVILLE et alii (1968) e LECADET et alii (1972). A função fisiológica do cristal na bactéria não está esclarecida, mas ele pode ser resultante da super-produção de proteína do revestimento do esporo. Quando o antissoro contra os cristais dissolvidos foi colocado frente à fração do esporo, quatro linhas de precipitação foram observadas, duas das quais eram comuns tanto à proteína do revestimento do esporo como à proteína do cristal. As linhas de precipitação de identidade eram antígenos do cristal de importância secundária. Entretanto, a fração de esporos extraída com uréia e β - mercaptoetanol tem o mesmo ponto isoelétrico, a mesma precipitabilidade por cátions e a mesma análise de aminoácidos que a proteína do cristal. Os mapas peptídicos foram semelhantes, assim como foram os padrões eletroforéticos.

ARONSON e FITZ-JAMES (1968) observaram que a proteína precursora do revestimento do esporo era sintetizada durante o desenvolvimento do pré-esporo, isto é, quase ao mesmo tempo em que o antígeno do cristal.

SOMERVILLE (1971) obteve alguns mutantes asporogênicos, cristalíferos, resistentes à estreptomicina e penicilina, que produziam uma substância tóxica para as larvas de quarto ínstar de Pieris rapae (Lepidoptera, Pieridae); os mutantes esporogênicos e acristalíferos não produziam. Estes resultados sugerem fortemente que a δ - endotoxina é responsável pela atividade inseticida e que os componentes do esporo, embora semelhantes imunologicamente, não são tóxicos.

LECADET et alii (1972) concluíram, entretanto, que uma proteína solúvel, semelhante ao cristal, é componente da capa do esporo e poderia estar relacionada com outras proteínas estruturais do esporo. Não foi determinado se esta proteína é tóxica.

Um trabalho anterior de LECADET e DEDONDER (1971) também apontou uma relação entre a proteína solúvel do cristal e as proteínas da capa do esporo.

3.4.3.4.5. Bioquímica da proteína do cristal

HANNAY e FITZ-JAMES (1955) afirmaram que os cris

tais de B. thuringiensis var. thuringiensis têm 17 por cento de nitrogênio e uma pequena quantidade de fósforo.

ANGUS (1956a) demonstrou que os cristais da var. sotto são semelhantes aos da var. thuringiensis, contendo 17.5 por cento de nitrogênio e nenhum fósforo. A análise dos hidrolisados ácidos dos cristais revelou que os aminoácidos presentes não são incomuns em variedade ou em quantidade, quando comparados com estudos semelhantes em outras espécies bacterianas.

Quanto à solubilidade do cristal, HANNAY e FITZ-JAMES (1955) demonstraram que os cristais de B. thuringiensis var. thuringiensis não se solubilizam até ser atingido o pH 11.8. FITZ-JAMES et alii (1958) também provaram que a solução dos cristais da var. alesti foi conseguida num pH entre 11.0 e 12.2.

YOUNG e FITZ-JAMES (1959b) sugeriram que o cristal pode ser sintetizado a partir de compostos de peso molecular relativamente baixo, os quais passam por um processo de "maturação", tornando o cristal mais insolúvel por causa da formação de pontes S-S.

LECADET (1966), num estudo sobre os efeitos dos agentes redutores: mercaptoetanol, tioglicolato e cisteína, sobre os cristais de B. thuringiensis var. thuringiensis, afirmou que as pontes S-S eram a ligação principal da proteína do

cristal. Várias concentrações destes agentes redutores num tampão bicarbonato 0.1M , em pH 9.5, dissolveram o cristal e converteram toda a cistina do cristal em cisteína. A adição de cistina em quantidades maiores que a do agente redutor cessava a dissolução. O autor interpretou isto como uma reconstituição das pontes dissulfídricas. Outra explicação seria que o excesso de cistina teria saturado a ação do agente redutor. Foi observado que a dissolução do cristal era proporcional à concentração do agente redutor presente. Todavia, foi proposto que outras pontes além da S-S poderiam estar envolvidas na dissolução. Os sub-produtos da dissolução do cristal foram passados por uma coluna de Sephadex G-25 e o produto obtido foi analisado por ultracentrifugação, encontrando-se três constituintes com constantes diferentes de sedimentação; suas proporções variaram de lote para lote de cristais e de acordo com a duração do processo de redução. A primeira fração (S_1) tinha um peso molecular de 10.000. A análise dos grupos NH_2 terminais permitiu verificar que, independentemente do método de redução, o grupo terminal das subunidades era ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e lisina, nas proporções 2:3:2:2.

FAUST e ESTES (1966) sugeriram que o silício forma a armação básica sobre a qual as moléculas de proteína são fixadas. Eles demonstraram que duas variedades de B. thuringiensis e B. finitimus contêm quantidades relativamente altas de silício no corpo parasporal e sugeriram que a proteína (ou

subunidades proteicas do cristal) é fixa numa forma insolúvel a uma unidade estrutural fundamental tal como o íon ortosilicato (SiO_4^{-4}), possivelmente através de ligações pelos íons ferro ou magnésio; em essência, eles sugerem que a solução da proteína do cristal é realmente efetuada pela solução da armação de silício.

Quimicamente, os corpos parasporais produzidos pelo B. thuringiensis são insolúveis em água, ácidos nítrico e hidrocloreídrico diluídos, e diversos solventes orgânicos comuns, como foi demonstrado por HANNAY (1953). Mas são solúveis em soluções alcalinas fracas tais como carbonato de sódio (Na_2CO_3), carbonato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) ou hidróxido de sódio (NaOH), de acordo com ANGUS (1956b) e FAUST e ESTES (1966). Os mesmos autores constataram que eles também são inertes frente a enzimas proteolíticas tais como tripsina, quimotripsina e pronase, exceto se tratados previamente com soluções alcalinas. Eles perdem sua atividade biológica (toxicidade) quando tratados com desnaturantes proteicos comuns e são termolábeis.

A análise química, tanto quantitativa como qualitativa, feita por ANGUS (1956b) e por HANNAY e FITZ-JAMES (1955), revelou a ausência de lipídios, carboidratos e fósforo. SPENCER (1968) constatou, na análise dos aminoácidos, a presença de 18 aminoácidos com o ácido aspártico e o ácido glutâmico respondendo por cerca de 25% dos aminoácidos presentes.

A resistência da B.t. δ - endotoxina à atividade

proteolítica, indicando uma ação inibitória, foi investigada por LECADET e DEDONDER (1966a,b; 1967), os quais observaram que as inclusões parasporais de B. thuringiensis resistem à ação de muitas proteases (tripsina, quimotripsina, papaína) ; isto é, as três enzimas são completamente destituídas de ação sobre os cristais sem desnaturação prévia. Além disso, eles constataram que a desnaturação sob a ação de uréia 8M permitia apenas uma hidrólise muito fraca, enquanto que a desnaturação pelo calor conduzia a uma lise completa pelas três enzimas. A fração proteica, isolada após cromatografia em Sephadex G - 75, foi submetida novamente à ação de uma preparação das proteases de larvas de Pieris brassicae (Lepidoptera, Pieridae) . Foi obtida uma hidrólise muito fraca, com a formação de um pico peptídico, mas nenhum aminoácido liberado. Eles também demonstraram que alguns fragmentos de alto peso molecular não são suscetíveis ou o são muito fracamente à ação das enzimas . ROGOFF e YOSTEN (1969) também observaram uma resistência diferencial dos polipeptídeos grandes do cristal à proteólise.

Os experimentos preliminares de SOMERVILLE et alii (1968) demonstraram que os extratos de cristais eram resistentes à digestão pela tripsina mesmo quando alcalinizados com ácido iodoacético. Apenas após a oxidação com o ácido perfórmico, o extrato de cristais foi intensamente hidrolisado pela enzima. O curso da hidrólise foi acompanhado pelo aparecimento de acidez titulável ou de material nihidrin-positivo ,

permitindo verificar que a reação estava 70% completa após 2 horas e totalmente completa após 8-10 horas.

A caracterização dos produtos hidrolíticos da B.t. δ - endotoxina foi feita por diversos investigadores, entre eles LECADET e DEDONDER (1967) e LECADET e MARTOURET (1967). A unidade tóxica, obtida após a dissolução e hidrólise (álcali e suco intestinal) do cristal, consiste de várias moléculas, cujos pesos moleculares podem variar entre > 200000 e ≈ 500000 .

Usando digeridos de cristais pelo suco intestinal de larvas de Pieris brassicae, LECADET e DEDONDER (1967) separaram uma fração de peso molecular > 40000 , demonstrando que ela continha pelo menos seis polipeptídeos com os seguintes aminoácidos N-terminais: ácido glutâmico, ácido aspártico, alanina, fenilalanina, glicina e tirosina. Apenas os peptídeos contendo aspartato como aminoácido N-terminal eram tóxicos por injeção.

FAST e ANGUS (1970) isolaram, de B. thuringiensis var. sotto, um fragmento tóxico com um peso molecular aparente entre 500 e 1000. Eles dissolveram os cristais parasporais em NaOH 0.04M, contendo β -mercaptoetanol 0,2M e então trataram os fragmentos com quimotripsina. O fragmento isolado é a unidade tóxica de mais baixo peso molecular relatado até hoje.

Segundo COOKSEY (1971), a δ - endotoxina é constituída quase inteiramente por aminoácidos. O autor fez uma compilação das composições de aminoácidos dos cristais de várias estirpes de B. thuringiensis.

HERBERT et alii (1971) separaram a proteína do cristal de B. thuringiensis var. tolworthi em duas cadeias polipeptídicas com peso molecular entre 55000 e 120000; elas apareciam numa proporção de 1:2 e o componente com um P.M. de 55000 era responsável pela maior parte da toxicidade do cristal dissolvido.

SAYLES et alii (1970) dissociaram o cristal em diversas subunidades de baixo peso molecular (~ 1000).

NORRIS (1974) estabeleceu que o cristal é composto por subunidades individuais, as quais, por sua vez, são constituídas por uma ou mais proteínas construídas a partir de cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente por pontes dissulfídricas e que podem ou não ser protoxinas (a verdadeira toxina seria uma molécula menor produzida por proteólise no intestino do inseto). A molécula tóxica pode ser uma cadeia inteira ou parte de uma cadeia, pode ser produzida a partir de diferentes cadeias polipeptídicas e pode diferir em sua toxicidade. Uma reação de precipitina com um antissoro contra o cristal intacto pode ser produzida por qualquer dos elementos de construção do cristal.

As evidências disponíveis apoiam a idéia de que o cristal é uma protoxina, a qual é ativada no intestino do inseto para produzir moléculas tóxicas de PM 5000. LECADET e DEDONDER (1967) encontraram quatro peptídeos diferentes de baixo peso molecular em sua fração peptídica. Os quatro eram tóxicos e dois deles, juntos representavam 80% da fração peptídica total. PENDLETON (1969) encontrou mais antígenos além dos anteriormente relatados e um deles estava particularmente associado à toxicidade de B. thuringiensis para Philosamia cynthia var. ricini (Lepidoptera, Saturniidae).

3.4.3.4.6. Modo de ação

A larva parece ser o único estágio do inseto suscetível à infecção pelas bactérias cristalíferas. A larva dos lepidópteros consiste essencialmente de um tubo digestivo envolvido pela parede do corpo. A cavidade da hemolinfa, fluido com muitas funções, é aberta. Vários tipos de células estão presentes, algumas das quais capazes de fagocitose. O pH da hemolinfa do inseto é, em geral, levemente ácido (5.6 a 7.0) e em pH normal está na sua capacidade tampão mais baixa. O coração é um órgão tubular localizado dorsalmente, o qual por contrações rítmicas impulsiona a hemolinfa através de aberturas laterais e a bombeia para a frente para banhar o cérebro, donde flui vagarosa e ventralmente para a extremidade posterior, através da hemocoele (HEIMPEL e ANGUS, 1960).

O tubo digestivo consiste primeiramente de uma cavidade ou intestino anterior, revestido com uma camada de exoesqueleto, idêntica à que forma a parede corporal externa. Este revestimento é impermeável à água. O pH do intestino anterior é comumente aquele do alimento e, nos que se alimentam de folhas, é, em geral, levemente ácido. O intestino anterior é separado do intestino médio por um forte esfíncter. As bordas dessa válvula contêm, em muitas espécies, células que produzem continuamente uma membrana e esta estrutura tubular fina (a membrana peritrófica) aparentemente protege as células delicadas do intestino médio contra injúrias por partículas agudas de alimento. O intestino médio secreta enzimas digestivas e compostos tampões e absorve os produtos da digestão. Anatomicamente, no intestino médio pode-se distinguir duas ou mais regiões com base nos tipos de células e, comumente, o pH do conteúdo em cada região anatômica é diferente. O conteúdo intestinal é altamente tamponado e, na ordem Lepidoptera, é, via de regra, alcalino. Algumas espécies têm um pH baixo (7.0 a 9.0) no conteúdo do intestino médio, enquanto que em outras o pH é relativamente alto (9.0 a 10.4). O intestino médio tem forte ação redutora em muitos lepidópteros. Atrás do intestino médio está o intestino posterior, conectado aos túbulos de Malpighi, ao reto fortemente musculoso e ânus. O intestino posterior e o reto são também revestidos com material exoesqueleto. O pH do intestino posterior e do reto é levemente ácido ou levemente alcalino (HEIMPEL, 1955a, 1956; HEIMPEL e ANGUS, 1958b).

O estágio larval é um estágio suscetível na vida do inseto. As larvas de lepidópteros devem ter acesso contínuo ao alimento se quiserem permanecer sadias e ter desenvolvimento completo. Muitas se alimentam continuamente (por ex., o bicho-da-seda); outras espécies se alimentam quatro ou cinco vezes ao dia, descansando nos intervalos. Quando as larvas estão se alimentando, os tampões são secretados numa velocidade máxima e o conteúdo intestinal está no seu pH mais alto. Se o inseto pára de se alimentar, o pH intestinal cai prontamente e a secreção de tampões aparentemente diminui. O pH volta a ficar fortemente alcalino apenas quando o alimento é reintroduzido no intestino (HEIMPEL e ANGUS, 1960).

ANGUS (1954) demonstrou que os cristais, isolados de culturas esporuladas de B. thuringiensis var. sotto, produziam paralisia geral nos bichos-da-seda.

Esta paralisia geral, considerada inicialmente um sintoma do efeito tóxico dos cristais em insetos, é uma anomalia. Estudos do efeito de B. thuringiensis var. thuringiensis sobre larvas de Colias eurytheme (Lepidoptera, Pieridae), feitos por STEINHAUS (1951), demonstraram que os insetos paravam de se alimentar logo após a ingestão de culturas esporuladas e morriam entre 24 e 48 horas, sem exibir paralisia geral. Como outros lepidópteros foram testados, logo tornou-se óbvio que a paralisia geral era mais uma exceção do que uma regra, mas um sintoma foi comum às espécies testadas: os insetos invariavelmente paravam de se alimentar poucos

minutos após a ingestão da toxina. Obviamente, a toxina estava afetando algumas espécies de um modo distintamente diferente de sua ação sobre a maioria das larvas da ordem Lepidoptera.

No intestino alcalino do bicho-da-seda, o componente tóxico do cristal é liberado inicialmente pela ação dos componentes alcalinos não enzimáticos sobre a estrutura cristalina (FAUST et alii, 1967). A ação tóxica primária, após a dissolução do corpo do cristal parasporal no intestino do inseto, resulta numa paralisia do intestino minutos após a ingestão dos cristais (HANNAY, 1953; ANGUS, 1954; YOUNG e FITZ-JAMES, 1959b).

Numa série de experimentos envolvendo o uso de fotografias com raio-X para traçar o movimento de sulfato de bário, HEIMPEL e ANGUS (1959) demonstraram que o alimento ingerido com toxina pára de se mover através do intestino. É óbvio que o intestino na larva infectada pára de funcionar. Estes estudos confirmaram as observações de VANKOVÁ (1957) que, ao dissecar larvas infectadas de Euproctis phaeorrhoea (Lepidoptera, Lymantriidae), notou que a função intestinal cessava poucas horas após se alimentarem. Não há dúvida de que se trata de um efeito da toxina completamente diferente daquele que ocorre no bicho-da-seda e em outros insetos que exibem paralisia geral 1 a 7 horas após ocorrer paralisia do intestino. Nestes últimos, a toxina é ingerida e atinge o intestino médio em 3 a 5 minutos. Cinco

minutos mais tarde, o pH da hemolinfa começa a mudar o seu valor normal 6.8 (larva de quinto ínstar) e se torna alcalino (ANGUS e HEIMPEL, 1959). O aumento do pH da hemolinfa acompanha o aparecimento da paralisia geral e é acompanhado por um decréscimo simultâneo no pH do conteúdo intestinal altamente alcalino. A explicação é a de que a toxina age muito rapidamente sobre o epitélio do intestino médio, destruindo sua integridade o suficiente para permitir que o conteúdo intestinal alcalino altamente tamponado caia na hemolinfa pobremente tamponada. Num grupo representativo de insetos suscetíveis, que não exibem paralisia geral, não há aumento no pH da hemolinfa (HEIMPEL e ANGUS, 1959). Injeções de tampão estéril provocaram, nestes últimos, uma paralisia geral idêntica àquela observada em bichos-da-seda infectados.

Os insetos da ordem Lepidoptera foram classificados em quatro grupos, de acordo com a sua reação ao B. thuringiensis:

- 1) a paralisia geral ocorre num grupo limitado de larvas de lepidópteros com alto pH no intestino, referidas como insetos tipo I, por exemplo, Bombyx mori. Esta paralisia é causada pela ação, sobre o epitélio do intestino médio, da toxina produzida pela bactéria cristalífera. Tais insetos também apresentam uma paralisia do intestino, a qual se torna evidente apenas se doses subletais da toxina forem administradas e, neste caso, a paralisia intestinal é seguida por uma queda no pH do intestino, permitindo aos esporos germinar e desenvolver uma septicemia.

- 2) o inseto tipo II (representado pela maior parte das espécies de lepidópteros testados) é atingido por paralisia intestinal poucos minutos após a ingestão da toxina e pára de se alimentar. Não há aumento no pH da hemolinfa e, consequentemente, nenhuma paralisia geral; o pH do intestino decresce vagarosamente como ocorre num inseto faminto (HEIMPEL, 1955a) e isto permite boa germinação e multiplicação de bactérias. Como estes insetos perecem num período mais curto que o exigido para morrer por inanição, há pouca dúvida de que as bactérias em proliferação precipitam sua morte.

VANKOVÁ (1957) observou que nem as células vegetativas nem os esporos de uma estirpe acristalífera de B. thuringiensis causavam a morte em larvas de Euproctis phaeor-rhoea, mas quando os cristais isolados de uma estirpe cristalífera eram adicionados aos esporos da estirpe acristalífera, resultava 100 por cento de mortalidade em 6 dias. A autora concluiu que os cristais meramente induziam a germinação dos esporos no intestino da lagarta, resultando uma septicemia. No intestino do inseto, durante a alimentação, os tampões são continuamente produzidos e as condições inibitórias para a germinação dos esporos são constantemente mantidas. A toxina do cristal injuria o intestino, que pára de funcionar, relaxa até paralisar e cessa a secreção. As condições mudam, o pH cai e a germinação de esporos ocorre. A ação primária e mais importante, entretanto, é o efeito da toxina sobre o intestino (ANGUS e HEIMPEL, 1959; HEIMPEL e ANGUS, 1959).

- 3) os insetos tipo III sucumbem à preparação total de B. thuringiensis: ambos, esporos e B.t. δ - endotoxina devem estar presentes para causar a morte, embora doses maiores de B.t. β - exotoxina isolada possam matar estes insetos. Este grupo é representado por Anagasta kuehniella (Lepidoptera, Pyralidae) e Porthetria dispar (Lepidoptera, Liparidae).

- 4) o inseto tipo IV consiste naqueles lepidópteros que não são suscetíveis à B.t. δ - endotoxina. Exemplos seriam os noctuídeos tais como Mamestra brassicae (Lepidoptera, Noctuidae).

LECADET e MARTOURET (1962) demonstraram que a hidrólise enzimática dos cristais dá origem a unidades menores de material proteico. Eles tentaram também demonstrar que estes produtos da digestão enzimática dos cristais eram tóxicos quando injetados.

HEIMPEL e ANGUS (1959) propuseram que as substâncias cementadoras das células poderiam ser um substrato para a B.t. δ - endotoxina. Baseados nesta sugestão, ESTES e FAUST (1964) determinaram que a substância cementadora das células em Galleria mellonella era, em parte, um mucopolissacarídeo composto de N-acetilglucosamine e ácido glucorônico (1:1). Eles examinaram a hemolinfa de larvas de bicho-da-seda intoxicadas com a B.t. δ - endotoxina e encontraram um aumento significativo desta substância na hemolinfa, 60 minutos após a ingestão. Isto indica que os mucopolissacarídeos foram hidrolisados durante o processo de intoxicação.

Estudos sobre o efeito da B.t. δ - endotoxina sobre Pieris brassicae feitos por MARTOURET et alii (1965) demonstraram que, após a ingestão forçada de uma dose LD_{100} (de 0,5 μ g de cristais por grama de P. brassicae), a célula tipo I da extremidade anterior do intestino médio permanecia no princípio inalterada; a célula tipo II, que constitui a maior par

te do epitélio do intestino médio de P. brassicae, degenerou de uma forma característica: o citoplasma foi lisado e os fragmentos das células foram liberados no lúmen do intestino. Ocorreu regeneração das células, dando uma aparência de estratificação irregular ao epitélio; finalmente, a maior parte do epitélio tipo II foi destruído, restando apenas as porções basais das células. A membrana peritrófica foi fragmentada e, neste instante, a célula tipo I na porção anterior começou a lisar.

FAST e ANGUS (1965) tentaram examinar a intensidade da vazão de material do intestino para a hemolinfa, administrando glicose e Na_2CO_3 marcados com C^{14} a larvas de bicho-da-seda de quinto ínstar alimentadas com B.t. δ - endotoxina. Eles observaram que, durante um período de 90 minutos, enquanto ocorria paralisia geral na larva, a transferência de carbonato permaneceu normal nos primeiros 20 a 25 minutos, após os quais a quantidade de carbonato transferida para a hemolinfa aumentou significativamente acima do normal. Enquanto que a quantidade de glicose marcada transferida para a hemolinfa diminuiu em relação ao normal, os autores postularam que a toxina afeta a membrana da célula de tal maneira que inibe o mecanismo de transporte ativo da célula. Como foi observado por FAST e ANGUS (1965), PIDGEN (1963) e SPECTOR e WILLOUGHBY (1963), a membrana basal e tecidos conectivos vizinhos têm alguma permeabilidade seletiva; qualquer coisa, que alterasse estas estruturas, poderia alterar a permeabilidade e não necessa

riamente sempre numa direção positiva.

Uma hipótese semelhante foi apresentada por BENZ (1966). Sua investigação indicou que a toxina causava anoxia, o que aumentava a permeabilidade da parede do intestino. Ele também sugeriu que os sintomas de paralisia geral eram causados pela passagem de uma substância paralisante do intestino para a hemolinfa. Seu trabalho, entretanto, presumia que a ação ocorria diretamente sobre a própria membrana e negava-se a considerar a possibilidade de sua ação sobre as proteínas transportadoras ou meramente como um efeito secundário da toxina, já que as alterações na transferência ocorrem após os efeitos sintomatológicos e histológicos da injúria.

BROERSMA e BUXTON (1967) observaram que as células epiteliais do intestino médio de Trichoplusia ni (Lepidoptera, Noctuidae) assumiam a aparência de desidratadas e se tornavam desgastadas. Algumas destas células se tornavam distorcidas, perdiam sua capacidade de corar e, finalmente os conteúdos celulares vazavam.

SUTTER e RAUN (1967) encontraram um efeito semelhante no lepidóptero Ostrinia nubilalis, onde áreas da membrana basal ficam expostas ao ataque pelas formas vegetativas. Isto significa que os esporos bacterianos germinam prontamente após serem ingeridos pela larva e que as formas vegetativas podem então penetrar pela membrana peritrófica e atacar o epitélio desorganizado do intestino médio. Eventualmente, os bacilos pe-

netrarão pela membrana basal. Quando o conteúdo intestinal se mistura com a hemolinfa, a larva morre. Não foi observada nenhuma forma vegetativa na hemolinfa de larvas vivas. A vacuolização geral do epitélio do intestino médio resulta da ruptura das microvilosidades das células taça. O retículo endoplasmático e as inclusões tipo lípidos estão ausentes no epitélio doente. Extrusões citoplasmáticas globulares das células do epitélio doente podem ser observadas apenas raramente no tecido normal. A toxina induz uma paralisia no tubo digestivo da larva, que responde identicamente em todos os estágios larvais.

RAMAKRISHKMAN (1968) demonstrou que há um aumento considerável na concentração de íon potássio na hemolinfa, após ingestão dos cristais parasporais (quatro a cinco vezes). Ele propôs que os íons potássio vêm do alimento e passam para a hemolinfa através das células epiteliais destruídas e que este aumento de potássio é responsável pela paralisia nos bichos da-seda. Mais tarde, PENDLETON (1970) modificou os experimentos de RAMAKRISHKMAN e demonstrou a vazão significativa de potássio do intestino médio para a hemolinfa. Entretanto, a diferença na concentração de potássio entre a hemolinfa e o intestino médio indica que, mesmo após ter ocorrido completa paralisia, o mecanismo de "bomba de íons" está ainda ativo para impedir a entrada na hemolinfa da maior parte do potássio do intestino médio. O pH da hemolinfa aumentou de 6.5 para 6.8 em paralisia completa e indica uma leve vazão de íons carbona-

to ou bicarbonato a partir do conteúdo alcalino do intestino médio. Numa dieta isenta de potássio houve um decréscimo na concentração de sódio e um aumento de potássio após a intoxicação, o que indicou que, na ausência de qualquer potássio do intestino, ocorre um fluxo de potássio de fontes intracelulares para a hemolinfa. PENDLETON propôs que os sintomas de intoxicação resultam de uma perda generalizada de potássio intracelular causada pela supressão do mecanismo de "bomba de íons", que regula os fluxos de sódio e potássio. GRIEGO et alii (1979) comprovaram a inibição do transporte ativo de íon potássio no intestino médio de Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae), após a ingestão da endotoxina de B. thuringiensis.

FAUST (1968) e FAUST et alii (1971a,b), em estudos sobre algumas reações químicas in vitro de cristais hidrolisados produzidos por diversas variedades de B.thuringiensis, revelaram que a toxina interage com certas proteínas de pHs isoelétricos alcalinos (citocromo c, gliceraldeído - 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e tripsina), e que em pHs quase neutros ocorre a precipitação da B.t. δ - endotoxina e estas proteínas. Acima do pH de neutralidade, essencialmente nenhuma precipitação ocorre, mas pode-se obter redução da forma oxidada do citocromo c e 100% de inibição de tripsina e GAPDH.

A reação de B.t. δ - endotoxina com outras proteínas depende do pH do meio, da concentração de B.t. δ - endotoxina e dos pontos isoelétricos das proteínas envolvidas. FAUST (

1968) sugeriu que a B.t. δ - endotoxina produzida pelo B. thuringiensis var. dendrolimus age da seguinte maneira: a toxina (pH isoeletrico 4.0) em pH 6.0 é alcalina em relação ao seu pH isoeletrico e existe como B.t. δ - endotoxina; citocromo c, GAPDH e tripsina, como têm pHs isoeletricos alcalinos e estão ácidos em relação a seus pHs isoeletricos, estão presentes como proteína⁺. Em pH 6.0, eles se combinam prontamente e o complexo que eles formam é insolúvel. O pesquisador concluiu que, em pH 6.0, a carga negativa líquida da toxina atrai fortemente a carga positiva líquida das proteínas suscetíveis, de modo que a carga líquida após interação das duas proteínas em pH 6.0 é igual a quase zero. Consequentemente, o complexo precipita. Como a B.t. δ - endotoxina tem um pH isoeletrico de quase 4, em pHs acima do seu pH isoeletrico, a carga da molécula de toxina se torna cada vez mais negativa; abaixo do seu pH isoeletrico, a carga se torna cada vez mais positiva à medida que são efetuadas mudanças na concentração de íons hidrogênio. As proteínas suscetíveis com um pH isoeletrico alcalino, tal como a tripsina (pH isoeletrico 10.5), tornar-se-iam carregadas mais positivamente, abaixo do pH isoeletrico e carregadas mais negativamente acima. Assim, quando as proteínas tais como as protaminas são misturadas com proteínas de pHs isoeletricos alcalinos num pH em que as duas substâncias estão carregadas alta e opostamente, ocorrem fortes interações. Aumentando ou diminuindo as concentrações de íons hidrogênio do meio, as cargas líquidas das moléculas interatuantes de proteína mudariam obviamente; conseqüentemente, é menos

provável ocorrer a precipitação, embora possa existir atração entre a carga positiva líquida e a carga negativa líquida das duas proteínas. Esta atração (ou interação de carga) mudaria a carga líquida de cada proteína e suas propriedades químicas devem então mudar. Evidências deste efeito ocorreram em suas investigações, isto é, em pH 8.4, a δ - endotoxina de B. thuringiensis var. dendrolimus pôde, em certas concentrações, inibir completamente a GAPDH, uma enzima importante da glicólise. Além disso, a precipitação da enzima não foi necessária para a inibição. O efeito da B.t. δ - endotoxina sobre a solubilidade de proteínas normalmente solúveis (pH 6.0) é mais uma evidência de sua habilidade em afetar as propriedades químicas destas proteínas.

FAUST (1968) sugeriu que o contato com as células epiteliais do intestino poderia fazer com que a B.t. δ - endotoxina interagisse antagonisticamente com as enzimas localizadas nas próprias membranas e também, caso ocorra entrada na célula, com certas enzimas e outras proteínas essenciais à manutenção da célula. A destruição ou inibição destas proteínas essenciais causaria a morte das células (reação em cadeia) e, eventualmente, a do inseto, especialmente num intestino alcalino-tamponado, onde os carbonatos escapariam subsequentemente pelo revestimento epitelial para a hemocoele.

Investigações histológicas foram feitas em diversos insetos alimentados com bactérias cristalíferas, mas a rea

ção do epitélio do intestino médio de Ostrinia nubilalis é particularmente interessante. Como de costume, o intestino pára de funcionar após a B.t. δ - endotoxina ser ingerida; entre - tanto, ao invés de relaxar, a musculatura primeiro se contrai num tônus prolongado, que tende a relaxar apenas após o desprendimento do epitélio intestinal ter iniciado. SUTTER e RAUN (1967) demonstraram que as células do epitélio intestinal soltavam-se da membrana basal e, em algum grau, umas das outras, começando na região anterior do intestino médio e progredindo posteriormente. Alterações intracelulares foram também descritas e incluíam : (a) desaparecimento, nas células infectadas, dos corpúsculos de inclusão tipo lípide, normalmente presentes em células sadias; (b) desarranjo das microvilosidades das células taça, causando uma vacuolização aparente destas células; (c) destruição do retículo endoplasmático.

LACEY e FEDERICI (1979) investigaram a patogênese e histopatologia do intestino médio resultantes da exposição de larvas de Simulium vittatum (Diptera, Simuliidae) a B. thuringiensis. Exames do epitélio do intestino médio de larvas moribundas revelaram um grau considerável de lise e desprendimento de células nos cecos gástricos e na primeira metade do intestino posterior. Os cecos sadios são caracterizados por uma camada de células poligonais grandes e achatadas com um bordo largo de microvilosidades. Estas células comtêm núcleos grandes com nucléolos alongados, e o citoplasma é uniformemente granu-

lado, estando ausentes quaisquer vacúolos grandes, mas contendo frequentemente grande número de grânulos de glicogênio. Nas larvas doentes, a aparência dos cecos depende do estágio da doença. Durante os estágios iniciais, as células aparecem levemente hipertrofiadas e parcialmente separadas umas das outras. Em estágios mais avançados os cecos adquirem muitas camadas como resultado da proliferação de células, ficam pleomórficos e perdem o bordo de microvilosidades. Além disso, as células e núcleos variam grandemente em tamanho, os nucléolos tornam-se redondos e o citoplasma das células fica frequentemente muito vacuolizado. Nos últimos estágios da doença, muitas células lisam ou se desprendem para o lúmen dos cecos e são degeneradas. Porções da membrana basal ficam sem células. O intestino anterior, com exceção das áreas contíguas aos cecos gástricos, parece não ser afetado, com exceção de alguns casos em que o epitélio inteiro se desprende. Nas larvas moribundas típicas, prosseguindo distalmente ao longo do intestino médio, a próxima região profundamente afetada é o intestino posterior. O dano inicia com a mudança do tipo de célula que ocorre na junção dos intestinos anterior e posterior. As células achatadas e uniformes do intestino anterior adquirem a forma colunar e bojuda das células do intestino posterior. A progressão da doença e os danos que ocorrem nas células do intestino posterior são semelhantes às que ocorrem nos cecos. A fase inicial da doença é marcada por uma leve hipertrofia celular e separação das células. Os espaços no epitélio sadio não

são incomuns devido à lise natural de células secretoras observada nesta região. Entretanto, o dano observado nas larvas doentes excede de longe o das larvas sadias. À medida que a doença progride, as células se dissociam, tornam-se aumentadas e vacuolizadas e se desprendem para o lúmen onde sofrem posterior degradação. Os núcleos regenerativos formam novas células que se tornam também doentes e se desprendem. Em muitos casos, estas novas células são desprendidas antes de se tornarem funcionais. Nos estágios mais avançados da doença, o epitélio inteiro se desprende e o canal do intestino posterior consiste apenas de uma membrana basal flácida. Uma invasão bacteriana secundária se torna aparente em muitas larvas neste estágio e logo após ocorre a morte. Não se observa bacteremia nas larvas moribundas.

HEIMPEL e ANGUS (1959) estabeleceram que o sítio primário de ação da toxina do cristal, na larva do bicho-da-seda, é o terço anterior do intestino médio. O conteúdo desta porção do intestino tem um pH de aproximadamente 9.8, que não é alto o suficiente para dissolver o cristal, a menos que um agente redutor esteja presente e, naturalmente, o conteúdo intestinal do bicho-da-seda é fortemente redutor. Para explicar a liberação rápida da toxina, os autores sugeriram que proteases do intestino do inseto liberam uma molécula tóxica menor. Os autores encontraram uma protease no intestino do bicho-da-seda capaz de hidrolisar a proteína do cristal e

sugeriram que os insetos não suscetíveis à bactéria cristalífera não têm tais enzimas. Em tal sistema, o cristal inerte poderia ser considerado uma pró-toxina.

3.4.3.4.7. Patogenicidade

B. thuringiensis tem um espectro de ação relativamente amplo.

STEINHAUS e BELL (1953) constataram a suscetibilidade ao B. thuringiensis em algumas espécies de Coleoptera.

Alguns Diptera mostraram-se suscetíveis ao B. thuringiensis var. thuringiensis (HALL e DUNN, 1958). Embora possuindo tratos digestivos em que o pH é comumente ácido ou levemente alcalino, tais insetos regurgitam um suco digestivo alcalino contendo proteases no meio nutritivo. Deste modo, eles podem hidrolisar o cristal, transformando-o em uma substância tóxica, fora do corpo e, então, ingeri-la com o alimento dissolvido.

Quase uma centena de espécies da ordem Lepidoptera é suscetível à B.t. δ - endotoxina e, entre elas, muitas pragas importantes. Alguns grupos taxonômicos (por ex., a família Geometridae) parecem ser menos suscetíveis (HEIMPEL e ANGUS, 1959).

A B.t. α - exotoxina afeta a larva de Pristiphora erichsonii (Hymenoptera) (HEIMPEL, 1967a).

Os digeridos de cristais de B. thuringiensis var. entomocidus causaram 60% de mortalidade quando injetados num fasmídeo (Orthoptera: Carausius morosus) (PENDLETON, 1970). As evidências indicaram que o modo de ação foi semelhante ao que ocorre em larvas de lepidópteros, já que algumas características de intoxicação, tais como vômitos e diarreia, foram observadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Temperatura de incubação

As culturas de B. thuringiensis, cuja temperatura de proliferação varia entre 10°C e 45°C, foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C, ou seja, 10°C abaixo de sua temperatura máxima de proliferação, segundo indicação de GORDON et alii (1973).

4.2. Isolamento

O isolamento de B. thuringiensis foi feito a partir de uma formulação comercial deste inseticida biológico, empregada no Brasil para o controle de insetos presentes em vários tipos de hortaliças, pastagens, fumo, florestas, plantas ornamentais e outras culturas. O ingrediente ativo de tal produto é uma estirpe de B. thuringiensis var. kurstaki (sorotipo III), isolada por DULMAGE (1970) da lagarta rosada do algodão (Pectinophora gossypiella (Lepidoptera, Gelechiidae)).

Uma alíquota do inseticida, sob a forma de pó molhável, foi colhida com uma alça de platina (diâmetro externo de 4 mm) e transferida para 5 ml de caldo simples. Após se obter uma suspensão bastante homogênea, esta foi semeada com uma espátula de Drigalski em três pontos diferentes de uma placa com ágar simples, de modo a se obter colônias isoladas, após incubação de 24 horas.

B. thuringiensis, quando semeado em ágar simples, dá origem a colônias de aspecto característico, inerente ao grupo do B. cereus. Normalmente, nas culturas após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias podem ser observadas macroscopicamente, são rugosas, com bordo irregular tendendo a formar um véu tipo pseudópodo (Figura 1).

Fig. 1 - B. thuringiensis . Cultura com 24 horas em ágar simples. Escala 1:1.

Constatada a presença de colônias com morfologia bem típica, parte de uma delas foi transferida, através de um fio de platina, para 5 ml de caldo simples. Depois de homogeneizada, uma gota da suspensão foi semeada, com pipeta Pasteur, em tubos com ágar simples inclinado, seguindo-se a incubação durante 24 horas, para manutenção da estirpe de B. thuringiensis.

4.3. Caracteres citobacterioscópicos

4.3.1. Coloração de Gram

A morfologia do B. thuringiensis foi observada em um esfregaço de uma cultura jovem, corado pelo método clássico de Gram.

No decorrer do presente trabalho, foi desenvolvida uma técnica, que permite obter uma suspensão isenta de certas impurezas do meio de cultura, entre elas, detritos de ágar e precipitados de outras substâncias estranhas e que, seguramente, prejudicam a coloração de cílios. Sobre uma placa com ágar simples recém-distribuído e prestes a solidificar, colocou-se, com rigorosos cuidados de assepsia, um disco de papel celofane. Comprimiu-se a região central do disco com um bastão de vidro, de modo a obter uma cavidade, onde foram depositados 2 ml de água destilada. Procedeu-se, então, à semeadura no conteúdo líquido com a estirpe de B. thuringiensis e posterior incubação durante 6 horas.

A partir da cultura, assim obtida, foi feito um esfregaço delgado com alça de platina em lâmina de microscopia, o qual, depois de seco ao ar, foi fixado cuidadosamente pelo calor na chama de um bico de Bunsen e corado pelo método de Gram, segundo Nicolle e modificado por Langeron, conforme a descrição de BIER (1975):

- a - Corar 1 minuto com solução de cristal violeta fenicada.
- b - Escorrer o corante e cobrir, durante 1 minuto, com solução de Lugol.
- c - Lavar abundantemente com água destilada.
- d - Diferenciar com álcool a 95% (tempo delicado).
- e - Lavar com água destilada até a mesma transcorrer límpida.
- f - Corar o fundo rapidamente, empregando fucsina fenicada de Ziehl diluída 1:10.
- g - Lavar com água destilada e secar ao ar sobre o calor da chama de um bico de Bunsen.

O esfregaço, ao exame microscópico com imersão, evidenciou a presença de bastonetes Gram-positivos, de extremidades arredondadas, dispersos ou dispostos em cadeias curtas (Figura 2).

4.3.2. Mobilidade e coloração de flagelos

A mobilidade do B. thuringiensis foi observada numa suspensão de formas móveis desta bactéria, selecionadas a través de quatro passagens seriadas da estirpe em tubo em U contendo ágar semi-sólido. O intervalo entre uma e outra pas

Fig. 2 - B. thuringiensis. Coloração de Gram. Escala 3000:1.

sagem foi o necessário para o bacilo, na sua fase mais móvel , attingir a superfície do meio de cultura no lado oposto ao da semeadura. Neste meio, que favorece o desenvolvimento do antígeno "H" (flagelar), a cultura foi semeada em picada e apresentou uma proliferação difusa e progressiva por toda a extensão do meio de cultura, indicando a sua evidente mobilidade.

A partir da cultura na última passagem em ágar semi-sólido, foi semeado um induto bacteriano num tubo com caldo simples, seguido de incubação durante 6 horas. A mobilidade desta cultura foi examinada em "gota pendente", de acordo com o método descrito por BIER (1975): uma gotícula do cultivo bacteriano foi colocada no centro de uma lamínula. Os bordos da cavidade de uma lâmina escavada foram untados discreta-

mente com vaselina e a lâmina foi, então, colocada sobre a lamínula, fazendo-se uma leve pressão para que a lamínula aderisse à vaselina, de modo que, ao se virar novamente a lâmina, a gotícula ficou pendente no centro da escavação, sem encostar no fundo da mesma. A focalização da gota foi feita primeiro com o menor aumento (pouca luz), colocando-se o bordo da gota no meio do campo microscópico. A seguir, focalizou-se progressivamente em aumentos maiores, corrigindo-se convenientemente a iluminação, por meio do diafragma do condensador, e, nestas condições, foi possível a constatação da mobilidade da estirpe de B. thuringiensis empregada no presente trabalho.

Para evidenciar os flagelos desta bactéria, através de coloração, foi feito um esfregaço da cultura de B. thuringiensis obtida pela mesma técnica empregada no cultivo do germe para a coloração de Gram. Uma gota do cultivo bacteriano foi colocada próxima a uma extremidade da lâmina e, apoiando-se uma lamínula sobre o material, correu-se a mesma sobre a lâmina, de modo a distender-se a suspensão num filme bem fino. Após secar o esfregaço ao ar, o mesmo foi corado pelo método de GRAY (1926) e, para isso, foram preparadas duas soluções:

Solução 1

Alúmen de potássio-solução saturada

aquosa 5 ml

Ácido tânico-solução aquosa a 20% 2 ml

(Adicionar algumas gotas de clorofórmio como conservante).

Bi-cloreto de mercúrio-solução saturada

aquosa 2 ml

Solução 2

Fucsina básica - solução saturada alcoólica

No momento de emprego, adicionou-se 0,4 ml da solução de fucsina à solução 1; as soluções foram misturadas sob agitação rotativa manual, dando origem a um precipitado.

O esfregaço foi totalmente coberto com 0,5 ml do preparado, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O mordente foi lavado delicadamente com água destilada. A seguir, o mesmo esfregaço foi coberto com fucsina de Ziehl, durante 10 minutos e imediatamente submetido a uma nova lavagem com água destilada. Após a secagem, o material foi submetido ao exame microscópico com imersão, onde foram evidenciadas as bactérias peritríquias, estando ambos, bacilos e flagelos, corados em vermelho (Figura 3).

4.3.3. Coloração de cápsula

A cápsula de B. thuringiensis foi evidenciada através da coloração, pelo método de Gram, de esfregaços feitos com alça de platina, a partir de dois tipos de materiais:

- a) hemolinfa de uma lagarta de Bombyx mori, recentemente morta em consequência de um processo toxi-infeccioso por B. thuringiensis. O exame citobacterioscópico revelou a presença de

Fig. 3 - B. thuringiensis. Coloração de cílios, segundo o método de Gray .
Escala 1875:1.

bacilos Gram positivos, dotados de cápsulas, que aparecem sob a forma de halos não corados, circundando os microrganismos, no fundo roxo (Figura 4).

- b) cultura de 6 horas de B. thuringiensis, obtida segundo a técnica descrita no subcapítulo 4.3.1. O referido material apresentou bacilos Gram positivos, circundados por uma visível cápsula, num fundo quase livre de partículas estranhas (Figura 5).

4.3.4. Coloração de contraste para esporos (negativa)

Para a visualização dos esporos de B. thuringiensis não foi empregado nenhum método especial de coloração, porque os esporos não corados foram facilmente reconhecidos através

Fig. 4 - Cápsula de *B. thuringiensis* em esfregaço de hemolinfa de *B. mori* infectada. Coloração de Gram. Escala 2250:1.

Fig. 5 - Cápsula de *B. thuringiensis* em esfregaço de uma cultura jovem. Coloração de Gram. Escala 2250:1.

da coloração de Gram, com cristal violeta a quente.

O esfregaço foi feito a partir de uma cultura do germe, contida em um tubo com ágar simples, fechado à lâmpada e armazenado a + 4°C, durante dois anos.

O material, examinado ao microscópio com imersão, apresentou bacilos dotados de endosporos subterminais de forma elipsoidal e bacilos na forma vegetativa, bem como esporos isolados, não corados e delineados por um halo de cor roxa. Além destes elementos, foi possível visualizar cristais dispersos, corados em roxo e com estrutura bi-piramidal, semelhante à da δ - endotoxina do B. thuringiensis e inconfundível com outros tipos de precipitações provenientes dos corantes empregados (Figura 6).

Fig. 6 - B. thuringiensis. Coloração de Gram, com cristal violeta a quente: a- bacilo com endosporo; b - forma vegetativa do bacilo; c - grupo de esporos; d - cristal com estrutura bi-piramidal, semelhante à da δ - endotoxina do B. thuringiensis. Escala 3000:1.

4.4. Aspectos culturais

O aspecto cultural do B. thuringiensis foi estudado através da semeadura de uma estirpe de manutenção do microrganismo em uma placa com ágar simples. Após a incubação durante 24 horas, uma colônia de morfologia típica foi semeada em uma placa com ágar simples e em uma placa com ágar sangue, de modo a se obter colônias isoladas.

O exame da placa com ágar simples, após 6 horas de incubação, revelou a presença de microcolônias, quase invisíveis a olho nu. Um preparado por impressão de uma dessas microcolônias foi obtido segundo a seguinte técnica: sobre uma colônia colocou-se uma lamínula e deixou-se a mesma aderir pelo próprio peso; a seguir, a lamínula foi levantada delicadamente com uma pinça, fixada pelo calor na chama de um bico de Bunsen, corada com azul de Kùhne e montada em bálsamo (BIER, 1975). Esta colônia, no exame em um microscópio Olympus modelo BH, com um aumento de 80 vezes, apresentou um aspecto semelhante a uma cabeça de Medusa (Figura 7). A observação da colônia, com 200 vezes de aumento, evidenciou a emergência de filamentos em torno da mesma (Figura 8). Melhores detalhes morfológicos de tais estruturas foram visualizados quando um segmento do bordo da colônia foi focalizado com um aumento de 800 vezes (Figura 9). Finalmente, a estrutura intrínseca dos filamentos, qual seja, longas cadeias paralelas de bacilos em plena forma vegetativa, foi revelada com 2000 vezes de aumento (Figura 10).

Fig. 7 - Microcolônia de B. thuringiensis ("Caput medusae").
Escala 90:1.

Fig. 8 - Microcolônia de B. thuringiensis ("Caput medusae").
Escala 225:1.

Fig. 9 - Segmento do bordo de uma microcolônia de B. thuringiensis.
Escala 900:1.

Fig. 10 - Cadeias de bacilos constituindo os filamentos de uma microcolônia
de B. thuringiensis. Escala 1500:1.

As microcolônias observadas, quando incubadas durante 24 horas, apresentaram o aspecto macroscópico característico do grupo do B. cereus e diâmetro irregular entre 8 - 10 mm (Figura 1).

Na placa contendo ágar sangue, as colônias características de B. thuringiensis mostraram uma acentuada hemólise, representada por um halo transparente ao seu redor (Figura 11).

4.5. Caracteres bioquímicos

A caracterização bioquímica de B. thuringiensis var. kurstaki foi feita de acordo com as normas estabelecidas por GORDON et alii (1973), a partir de uma estirpe de manutenção cultivada em placa com ágar simples.

Para a semeadura dos meios de cultura utilizados nas provas bioquímicas, a cultura pura obtida foi colhida com uma pipeta Pasteur e suspensa em água fisiológica, de modo a se obter uma concentração de bactérias equivalente ao tubo 3 da escala de McFarland (900 milhões/ml). A alíquota da suspensão empregada consistiu em duas gotas de pipeta Pasteur para cada tubo e na superfície das placas foi depositado, com um fio de platina, um inóculo suficiente para se obter colônias isoladas através da semeadura com a espátula de Drigalski.

Os tubos utilizados continham, aproximadamente,

Fig. 11 - Hemólise produzida por colônias de B. thuringiensis em placa com ágar sangue. Entre elas, observa-se uma colônia de onde foi retirado inóculo para os testes de identificação. Escala 1:1.

5 ml de meio de cultura e, para cada caráter estudado, foram sempre preparados, paralelamente, tubos controle não semeados.

4.5.1. Reação de catalase

A produção de catalase foi evidenciada da seguinte maneira: sobre duas culturas de B. thuringiensis semeadas, respectivamente, em um tubo de caldo simples e em uma placa com ágar simples, foram pipetadas algumas gotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 volumes.

A produção imediata e abundante de bolhas, evidência da rápida decomposição de H_2O_2 , indicou que a cultura deve ser considerada catalase positiva (Figura 12: tubo 1).

4.5.2. Proliferação em anaerobiose

A estirpe de B. thuringiensis foi semeada de acordo com a técnica adequada, em dois meios de cultura, contidos em tubo: "Bacto-Fluid Thioglycollate Medium" (B256) e meio de Tarozzi.

A proliferação do microrganismo foi observada em toda a extensão de ambos os tubos (Figura 12: tubos 3 e 5).

4.5.3. Reação de Voges-Proskauer

A reação de Voges-Proskauer foi evidenciada em um tubo com meio de Clark e Lubs pH 6.9, semeado com a estirpe de B. thuringiensis.

Fig. 12 - Caracteres bioquímicos de *B. thuringiensis*: 1 - reação positiva de catalase, com evidente liberação de oxigênio; 3 - "Bacto-Fluid Thioglycollate Medium" semeado; 5 - meio de Tarozzi semeado mostrando intensa proliferação; 7 - reação positiva de Voges-Proskauer (pH 6.9); 8 - reação negativa de Voges-Proskauer (pH 4.3); 9 - reação positiva de Voges-Proskauer (pH 5.6); 2, 4, 6 e 10 - controles não semeados. Escala 1:2.5.

Após 24 horas de incubação, adicionou-se 3 ml de alfa-naftol 5% em álcool etílico absoluto e 1 ml de hidróxido de potássio (KOH) 40% ao meio de cultura. O desenvolvimento de uma coloração vermelho magenta, após 30-60 minutos, à temperatura ambiente, denotou a presença de acetilmetilcarbinol (acetoína) (Figura 12: tubo 7).

Esta reação é atribuída à oxidação atmosférica da acetoína, que é transformada em diacetila, a qual, reagindo com KOH e com um constituinte do meio, portador de um grupo guanidínico, produz coloração vermelha.

4.5.4. pH no meio de Clark e Lubs (reação de Voges-Proskauer - V.P.)

A produção de acetilmetilcarbinol foi testada em dois tubos com meio de Clark e Lubs, um com pH 4.3 e outro com pH 5.6, segundo a mesma técnica empregada no subcapítulo 4.5.3. Foi possível constatar um resultado positivo apenas na cultura em pH 5.6 (Figura 12: tubos 8 e 9).

4.5.5. Temperaturas máxima e mínima de proliferação

A proliferação do B. thuringiensis foi determinada em tubos com caldo simples, incubados em intervalos de 5°C de temperatura, variando de 0°C até 50°C. A leitura foi efetuada 5 dias após a semeadura do meio de cultura, demonstrando que as temperaturas mínima e máxima necessárias para o desenvolvimento do microrganismo foram, respectivamente, 10°C e

Fig. 13 - Caracteres bioquímicos de B. thuringiensis: 11 - não proliferação em caldo simples, a 50°C; 12 - proliferação em caldo simples, a 10°C; 13 - proliferação em caldo simples, a 45°C; 14 - não proliferação em caldo simples, a 50°C; 15 - caldo gema-de-ovo semeado; 16 - controle não semeado; 17 - proliferação em caldo simples isento de NaCl; 18 - proliferação em caldo simples com 5% de NaCl; 19 - não proliferação em caldo simples com 7% de NaCl; 20 - não proliferação em caldo simples com 10% de NaCl. Escala 1:2.

45°C (Figura 13: tubos 11, 12, 13 e 14).

4.5.6. Reação gema de ovo

Um tubo de ensaio com caldo gema de ovo e uma placa com ágar gema de ovo foram semeados com B. thuringiensis e observados após incubação durante 1, 3, 5 e 7 dias.

Uma reação positiva completa foi traduzida pela formação de uma forte precipitação na superfície do caldo; entretanto, a mesma reação foi mais evidente na placa, onde foi observada uma intensa precipitação, contrastando com a opalescência da emulsão de lecitina (gema de ovo) incorporada no meio de cultura (Figura 13: tubo 15; Figura 14).

Fig. 14 - Colônia de B. thuringiensis em ágar gema de ovo. Escala 1:1.

4.5.7. Proliferação em várias concentrações de cloreto de sódio (NaCl)

Tubos com caldo simples contendo 0, 5, 7 e 10 por cento de NaCl foram semeados e a proliferação do B. thuringiensis foi observada após 7 e 14 dias de incubação. Foi constatado que a estirpe não desenvolveu no meio de cultura com 7% de NaCl, contrastando com 85-100% das estirpes estudadas por GORDON et alii (1973). O mesmo fenômeno foi observado no meio de cultura com 10% de NaCl (Figura 13: tubos 17, 18, 19 e 20).

4.5.8. Utilização de carboidratos

O meio básico utilizado para determinar a produção de ácido pela estirpe de B. thuringiensis foi o de Ayers et alii modificado por GORDON et alii (1973). Os carboidratos utilizados foram D (+)-glicose, L(+)-arabinose, D(+)-xilose e D(-)-manitol. As culturas foram observadas quanto à proliferação e produção de ácido ou gás (bolhas de gás no interior do ágar), após 7 e 14 dias de incubação.

Houve viragem do indicador púrpura de bromocresol para a cor amarela, apenas no tubo contendo glicose, indicando a sua intensa fermentação, com produção abundante de gás na base do meio de cultura. Com referência aos carboidratos arabinose, xilose e manitol, apesar da intensa proliferação do microrganismo, não houve desdobramento dos mesmos e, consequentemente, nenhuma alteração do indicador (Figura 15: tubos 21,

22, 23 e 24).

4.5.9. Hidrólise do amido

Um tubo com o meio de Ayers et alii modificado por GORDON et alii (1973), acrescido de 0.5% de amido, foi semeado, permitindo constatar a fermentação do referido carboidrato pelo B. thuringiensis, após 7 e 14 dias de incubação (Figura 15: tubo 25).

Duas placas com ágar amido foram semeadas e, após 3 e 5 dias de incubação, respectivamente, as culturas receberam uma solução de lugol como reativo para evidenciação da utilização do amido. Neste tipo de reação, há formação do complexo iodo-amido, revelada pela cor azul. Foi constatado, nas culturas, um halo incolor ao redor das colônias, indicando a hidrólise do carboidrato e, portanto, ausência da formação do precipitado de cor azul (Figura 16).

4.5.10. Proliferação em pH 5.7

Um tubo com caldo Sabouraud dextrose (pH final 5.7), enriquecido com 1.5% de extrato de levedo, foi semeado com B. thuringiensis e, a seguir, incubado. O desenvolvimento do germe no meio de cultura, durante duas semanas de incubação foi considerado como proliferação em pH 5.7 (Figura 15: tubo 26).

Fig. 15 - Caracteres bioquímicos de *B. thuringiensis*: 21 - fermentação de glicose, com produção abundante de gás na base do tubo; 22, 23, 24 - ausência de fermentação, respectivamente, da arabinose, xilose e manitol; 25 - fermentação do amido; 26 - proliferação em pH 5.7; 28 - proliferação em caldo citrato de Koser; 30 - proliferação em caldo nitrato; 27, 29, 31 - controles não semeados. Escala 1:2.5.

Fig. 16 - Colônias de B. thuringiensis em ágar amido: teste positivo da hidrólise do referido carboidrato, com reativo de Iugol. Escala 1:1.

4.5.11. Utilização do citrato

Mediante a semeadura de um tubo com caldo citrato de Koser, a utilização do citrato foi confirmada pela intensa proliferação do B. thuringiensis, após 14 dias de incubação (Figura 15: tubo 28).

4.5.12. Redução de nitrato a nitrito

A presença de nitrito em uma cultura de B. thuringiensis contida num tubo com caldo nitrado (Figura 15: tubo 30) foi pesquisada após 3 e 7 dias de incubação, umedecen-

do uma tira de papel de amido, contendo iodeto de potássio , com algumas gotas de ácido clorídrico 1N e tocando, a seguir, o papel com uma alíquota da cultura. Uma côr púrpura indicou uma reação positiva.

4.5.13. Hidrólise da caseína

Esta prova bioquímica foi evidenciada através de dois meios de cultura: leite simples (Figura 17: tubo 32) e ágar leite (Figura 17: tubo 34 e Figura 18).

Após 7 e 14 dias de incubação, foi possível verificar uma evidente transparência (hidrólise) na parte superior das culturas em tubo e ao redor das colônias na cultura em placa.

4.5.14. Hidrólise da tirosina

A tirosina, sob ação da tirosinase liberada pelo B. thuringiensis, foi hidrolisada, tornando o meio de cultura transparente ao redor das colônias do microrganismo semeado em uma placa com ágar tirosina. Esta reação positiva foi evidenciada após 7 e 14 dias de incubação (Figura 19).

4.5.15. Reação no leite tornassolado

Um tubo com leite tornassolado foi semeado e observado, após 7 e 14 dias de incubação, quanto à viragem do indicador, formação de coágulo e gás, e digestão da caseína .

Fig. 17 - Caracteres bioquímicos de B. thuringiensis: 32, 34, 36 - hidrólise da caseína, respectivamente, em leite simples, ágar leite e leite tornassolado; 38 - reação positiva de urease; 33, 35, 37, 39 - controles não semeados. Escala 1:1.5.

Fig. 18 - Colônias de B. thuringiensis em ágar leite: hidrólise da caseína. Escala 1:1.

Fig. 19 - Colônias de B. thuringiensis em ágar tirosina: hidrólise do referido aminoácido. Escala 1:1.

Foi observada uma coagulação, seguida de uma reação alcalina e posterior digestão da caseína, dando um aspecto transparente ao terço superior da cultura e uma tênue alteração na parte inferior da mesma (Figura 17: tubo 36).

4.5.16. Hidrólise da gelatina

Esta reação pode ser realizada tanto em tubo como em placa com ágar nutriente gelatina. No presente trabalho, foi dada preferência à última alternativa, dada a facilidade que oferece para a leitura e interpretação dos resultados.

O teste de hidrólise da gelatina é baseado na precipitação da mesma, em presença de uma solução aquosa de bi-cloreto de mercúrio (HgCl_2) a 10%, depositada sobre a superfície do meio de cultura. Decorridos 10 minutos de contato, o excesso é desprezado e nestas condições, a reação pode ser evidenciada através de uma leitura bastante característica.

A gelatinase elaborada pelas colônias de B. thuringiensis foi responsável pelo halo transparente observado ao seu redor, o que indicou, conseqüentemente, uma reação positiva, após 4 dias de incubação (Figura 20).

4.5.17. Hidrólise da uréia

Esta prova bioquímica foi constatada numa cultura de B. thuringiensis semeada em um tubo com uréia Stuart. Após 4 dias de incubação, uma reação positiva de urease (hidró

Fig. 20 - Colônias de B. thuringiensis em ágar nutriente gelatina: teste positivo para hidrólise. Escala 1:1.

lise da uréia) foi indicada pela mudança de côr do amarelo-alaranjado (pH 6.8) para o vermelho-cereja (pH 8.1 ou mais alcalino) (Figura 17: tubo 38).

O mecanismo dessa reação consiste no seguinte : a urease liberada pelo B. thuringiensis durante o seu metabolismo, como bio-catalisador, hidrolisa a uréia, com liberação de amônia (NH_3), a qual, em presença de água, se transforma em hidróxido de amônio (NH_4OH), resultando a alcalinidade do meio de cultura.

Um sumário das propriedades gerais da estirpe de B. thuringiensis var. kurstaki estudada é apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades da estirpe de B. thuringiensis var. kurstaki estudada.

Propriedades	<u>B. thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u>
Bacilos:	
Largura, μ	1
Comprimento, μ	5
Reação de Gram	+
Mobilidade (peritríquia)	+
Cápsula	+
Esporos:	
Elipsoidal	+
Subterminal	+
Colônias em ágar simples:	
Diâmetro, mm	8 - 10
Rugosa	+
Bordo irregular	+
Hemólise no ágar sangue	+
Reação de catalase	+
Proliferação em anaerobiose	+
Reação de Vogler-Proskauer (V.P.)	+
pH no meio de Clark e Lubs (reação de V.P.):	
pH 4.3.	-
pH 5.6.	+

(continua)

(continuação)

Propriedades	<u>B. thuringiensis</u> <u>var. kurstaki</u>
Temperatura de proliferação, °C:	
Máxima	45
Mínima	10
Reação gema de ovo	+
Proliferação em diferentes concentrações de NaCl:	
0%	+
5%	+
7%	-
10%	-
Utilização de:	
Glicose	+
Arabinose	-
Xilose	-
Manitol	-
Hidrólise do amido	+
Proliferação em pH 5.7.	+
Utilização do citrato	+
Redução de nitrato a nitrito	+
Hidrólise de :	
Caseína	+
Tirosina	+
Reação no leite tornassolado	AlD ^a /
Hidrólise da gelatina	+
Hidrólise da uréia	+

a/ Al, reação alcalina; D, digestão da caseína.

4.6. Fórmulas dos meios de cultura empregados no isolamento e caracterização de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

A esterilização dos meios de cultura foi feita através de autoclavagem a 121°C, durante 15 minutos, salvas as exceções indicadas no texto.

Os meios sólidos, após a esterilização, foram resfriados a 45-50°C e distribuídos, assepticamente, em vasilhames (tubos ou placas) previamente esterilizados em forno Pasteur.

Em todos os meios de cultura, a esterilidade foi sempre comprovada nas condições térmicas específicas para cada manipulação.

4.6.1. Ágar amido (GORDON et alii, 1973)

(fórmula para 100 ml, v/v)

Ágar nutriente	90 ml
Solução aquosa a 10% de amido solúvel (p/v)	10 ml

Ao ágar nutriente, fundido e resfriado a 45-50°C, juntar a solução aquosa de amido solúvel, de modo a obter perfeita incorporação do amido. Enquanto quente, promover a esterilização.

4.6.2. Ágar gema de ovo

(fórmula para 100 ml, v/v)

Ágar simples, estéril	90 ml
-----------------------	-------

Gema de ovo de galinha	10 ml
------------------------	-------

Ao ágar simples, fundido e resfriado a 45-50°C, adicionar gema de ovo de galinha colhida assepticamente, agitar gentilmente para evitar bolhas e distribuir.

4.6.3. Ágar leite

(fórmula para 100 ml, v/v)

Leite fresco de vaca	10 ml
----------------------	-------

Ágar simples, estéril	90 ml
-----------------------	-------

Centrifugar o leite a 1500-2000 rpm, durante 15 minutos e separar a capa de gordura; a seguir, esterilizar a 100°C, durante 30 minutos, por 3 dias sucessivos. Ao ágar simples, fundido e resfriado a 45-50°C, juntar o leite com assepsia, agitando bem para homogeneizar, e distribuir.

4.6.4. Ágar nutriente (GORDON et alii, 1973)

(fórmula para 100 ml, p/v)

Peptona	0.5 g
---------	-------

Extrato de carne	0.3 g
------------------	-------

Ágar	1.5 g
------	-------

Água destilada q.s.	100 ml
---------------------	--------

Dissolver a peptona e o extrato de carne na água e ajustar o pH a 6.8. Incorporar o ágar, fundir, esterilizar e distribuir.

4.6.5. Ágar nutriente gelatina

(fórmula para 100 ml, p/v)

Gelatina (põ)	2 g
Ágar nutriente	100 ml

Ao ágar nutriente, fundido e resfriado a 45-50°C, incorporar a gelatina, gradualmente e sob agitação. Esterilizar e distribuir.

4.6.6. Ágar sangue (BIER, 1975)
(fórmula para 100 ml, v/v)

Ágar simples, estéril	90 ml
Sangue desfibrinado (estéril) de carneiro	10 ml

Fundir o ágar simples, resfriar a 45-50°C e adicionar o sangue com assepsia. Misturar bem e distribuir.

4.6.7. Ágar semi-sólido (COWAN e STEEL, 1970)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Ágar	0.2 g
Caldo simples	100 ml

Incorporar o ágar ao caldo simples. Fundir , distribuir em tubos em U e esterilizar.

4.6.8. Ágar simples (BIER, 1975)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Extrato de carne	0.3 g
Peptona	1 g
Cloreto de sódio	0.5 g
Ágar	2 g

Água destilada q.s.	100 ml
---------------------	--------

Dissolver a quente todos os ingredientes, excepto o ágar. Ajustar o pH a 7.4 - 7.6, incorporar o ágar e fundir em autoclave a 110°C, durante 30 minutos. Reajustar o pH, se necessário. Esterilizar e distribuir.

4.6.9. Ágar tirosina

(fórmula para 100 ml, v/v)

Solução aquosa a 5%

de l - tirosina	10 ml
-----------------	-------

Ágar simples, estéril	90 ml
-----------------------	-------

Esterilizar a solução aquosa de l-tirosina a 110°C, durante 30 minutos. Enquanto quente, incorporar a suspensão homogênea do referido aminoácido ao ágar simples, fundido e resfriado a 45-50°C e, em seguida, distribuir.

4.6.10. Caldo citrato de Koser (COWAN e STEEL, 1970)

(fórmula para 100 ml, p/v)

Cloreto de sódio	0.5 g
------------------	-------

Sulfato de magnésio heptahidratado	0.02 g
---------------------------------------	--------

Fosfato ácido de amônio	0.1 g
-------------------------	-------

Fosfato ácido de potássio	0.1 g
---------------------------	-------

Água destilada q.s.	100 ml
---------------------	--------

Dissolver os sais na água.

Ácido cítrico	0.2 g
---------------	-------

Adicionar o ácido cítrico à solução de sais e aguardar a completa dissolução. Ajustar o pH a 6.8, filtrar em algodão hidrófilo, esterilizar a 115°C, durante 20 minutos e distribuir.

4.6.11. Caldo gema de ovo

(fórmula para 100 ml, v/v)

Caldo simples, estéril	90 ml
------------------------	-------

Gema de ovo de galinha	10 ml
------------------------	-------

Ao caldo simples incorporar a gema de ovo de galinha, colhida assepticamente. Agitar sem promover espuma e distribuir.

4.6.12. Caldo nitrado (BIER, 1975)

(fórmula para 100 ml, p/v)

Nitrato de potássio	0.1 g
---------------------	-------

Caldo simples	100 ml
---------------	--------

Adicionar o nitrato de potássio ao caldo simples, distribuir e esterilizar.

4.6.13. Caldo Sabouraud dextrose (GORDON et alii, 1973)

(fórmula para 100 ml, p/v)

Neopectona	1 g
------------	-----

Dextrose	2 g
----------	-----

Extrato de levedo (Difco)	1.5 g
---------------------------	-------

Água destilada q.s.	100 ml
---------------------	--------

pH 5.7

Dissolver os componentes, distribuir e esterilizar.

4.6.14. Caldo simples (BIER, 1975)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Extrato de carne	0.3 g
Peptona	1 g
Cloreto de sódio	0.5 g
Água destilada q.s.	100 ml

Dissolver a quente os ingredientes, ajustar o pH a 7.4 - 7.6, distribuir e esterilizar.

4.6.15. "Fluid Thioglycollate Medium" (DIFCO MANUAL, 1972)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Extrato de levedo	0.5 g
Casitona	1.5 g
Dextrose	0.5 g
Cloreto de sódio	0.25 g
l-cistina	0.075 g
Ácido tioglicólico	0.03 ml
Ágar	0.075 g
Resazurina, padronizada	0.001 g

Suspender 2.95 g de "Bacto-Fluid Thioglycollate Medium" (B256) em 100 ml de água destilada. Aquecer até a fervura para dissolver completamente o meio. Distribuir e esterilizar.

4.6.16. Leite simples (BIER, 1942)

Leite não pasteurizado, fresco	100 ml
--------------------------------	--------

Colocar o leite num funil de separação e deixar uma noite na geladeira a + 4°C para separar o creme que sobrenada. Colher o leite isento de gordura. Distribuir e esterilizar a 100°C (vapor fluente), durante 30 minutos, em três dias consecutivos.

4.6.17. Leite tornassolado

(fórmula para 100 ml, v/v)

Leite fresco desnatado, estéril	95 ml
---------------------------------	-------

Solução aquosa a 1.5% de tornassol (p/v)	5 ml
---	------

Esterilizar a 121°C, durante 15 minutos, a solução aquosa de tornassol. Juntá-la, assepticamente, ao leite e distribuir.

4.6.18. Meio de Ayers et alii modificado (GORDON et alii, 1973)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Fosfato ácido de amônio	0.1 g
Cloreto de potássio	0.02 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0.02 g
Extrato de levedo	0.02 g
Ágar	1.5 g
Água destilada q.s.	100 ml

Dissolver todos os constituintes do meio bási-

co, exceto o ágar. Ajustar o pH a 7.0, incorporar o ágar e fundir a 100°C, durante 30 minutos.

Solução alcoólica a 0.04% de
púrpura de bromocresol (p/v) 1.5 ml

Adicionar a solução alcoólica de púrpura de bromocresol e esterilizar. Ao meio básico, assim preparado, incorporar assepticamente 0.5% do carboidrato em solução aquosa, previamente esterilizado por filtração.

4.6.19. Meio de Clark e Lubs (BIER, 1975)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Peptona	0.5 g
Fosfato ácido de potássio	0.5 g
Água destilada q.s.	95 ml

Dissolver os constituintes, ajustar o pH de acordo com as exigências dos testes na reação de Voges-Proskauer (V.P.) e esterilizar.

Solução aquosa a 10%
de glicose (p/v) 5 ml

Ajuntar, com assepsia, a solução de glicose previamente esterilizada por filtração e distribuir.

4.6.20. Meio de Tarozzi
(fórmula para 100 ml, p/v)

Fígado fresco de bovino, em pedaços	40 g
Caldo simples	100 ml

Juntar o fígado ao caldo simples e aquecer 30 minutos a vapor fluente. Separar o caldo, filtrá-lo em lâ de vidro e reajustar o pH a 7.8. Lavar os pedaços de fígado em água corrente, isenta de cloro; recortá-los em cubos de aproximadamente 1 cm de aresta e submetê-los a uma nova lavagem. Colocar dois cubos de fígado no fundo de cada tubo e adicionar, aproximadamente, 4 ml de caldo simples. Cobrir com 0.5 ml de vaselina pastosa fundida e esterilizar a 115°C, durante 20 minutos.

4.6.21. Uréia Stuart (STUART et alii, 1945)
(fórmula para 100 ml, p/v)

Extrato de levedo	0.01 g
Fosfato ácido de potássio	0.91 g
Fosfato básico de sódio	0.95 g
Uréia	2 g
Vermelho de fenol	0.001 g
Água destilada q.s.	100 ml

Ajustar o pH a 6.8, filtrar em filtro "Milli - pore" 0.45 μ e distribuir com assepsia.

4.7. Preparação do antígeno

A estrutura antigênica do B. thuringiensis é pouco descrita na literatura. Entretanto, considerando a analogia entre ele e o B. anthracis, no que se refere à morfologia bacteriana e determinados caracteres bioquímicos, há proba

bilidade das duas espécies estarem constituídas e estruturadas antigenicamente em condições semelhantes.

Fundamentando-se neste conceito, foi utilizado na imunização um "pool" de antígenos, constituído por: antígeno H ou flagelar, antígeno O ou somático, antígeno K ou capsular e antígeno E ou esporos de B. thuringiensis var. kurstaki.

Numa imunização prévia, incluiu-se também, no "pool" de antígenos, uma solução de cristais parasporais. Todavia, na fase de imunização, os animais apresentaram uma reação incomum, que acarretou a sua morte. Na necrópsia dos coelhos foi constatado macroscopicamente que o tubo gastro - intestinal apresentava intensas zonas de eritema e, inclusive, muco com espessamento da parede tissular. Provavelmente, a endotoxina incorporada ao antígeno total tenha interferido no fenómeno observado.

4.7.1. Antígeno H ou flagelar

A designação de antígeno H, dada ao antígeno flagelar, provém do termo "Hauch" - bafo, usado genericamente para denominar a vegetação difusa das formas peritríquias na superfície do ágar simples bem úmido.

Para a obtenção deste antígeno, foi necessário ativar a mobilidade do B. thuringiensis, mediante o seguinte processo:

- a - A cultura de B. thuringiensis mantida em ágar simples sofreu cinco passagens em ágar semi-sólido contido em tubo em U ou tubo de Craigie. Durante as passagens, o tempo de incubação foi se tornando progressivamente menor, devido à seleção de formas cada vez mais móveis.
- b - A estirpe foi semeada em dois frascos de caldo simples (150 ml) e incubada durante 16 horas.
- c - À suspensão foi adicionado formol a 0.5% para matar os microrganismos e preservar o antígeno H, seguindo-se nova incubação durante 48 horas, a fim de se obter o antígeno na fase final.
- d - A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm, durante 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado.
- e - O sedimento foi ressuspendido em água fisiológica formolada a 0.3% e armazenado a + 4°C.

4.7.2. Antígeno O ou somático

A designação antígeno O provém do termo " Ohne Hauch " - sem bafo, aplicado à proliferação em ágar simples das formas atríquias, dando origem a colônias de contorno circular e limitado.

O antígeno somático é um polissacáride presente no corpo do B. thuringiensis, à semelhança com outros microrganismos do grupo cereus, e foi obtido da seguinte maneira:

- a - Uma alíquota da cultura de B. thuringiensis mantida em ágar simples foi colhida com alça de platina e transferida para

5 ml de caldo simples. Após homogeneização da suspensão, a mesma foi utilizada na semeadura de duas garrafas de Roux com ágar simples, livre de excesso de líquido na superfície, as quais foram incubadas em posição invertida, durante 48 horas.

- b - A cultura obtida foi removida com 20 ml de água fisiológica, resultando uma suspensão bem densa.
- c - Essa suspensão foi aquecida duas vezes a 121°C, durante uma hora, com um intervalo de 24 horas.
- d - O antígeno obtido foi lavado com água fisiológica formulada a 0.3% como preservante e estocado a + 4°C.

4.7.3. Antígeno K ou capsular

O antígeno K ou capsular, um polipeptídeo existente na cápsula do B. thuringiensis, foi assim preparado:

- a - Uma alíquota da cultura de B. thuringiensis mantida em ágar simples foi transferida com uma alça de platina para 5 ml de caldo simples. A suspensão homogeneizada foi utilizada na semeadura de dois tubos com ágar simples enriquecido com 0.1% de "PPL0 - Serum Fraction" (fração albumina de soro bovino) e incubados, a seguir, durante 24 horas.
- b - Uma alíquota desta cultura, colhida com alça de platina, foi suspensa em 5 ml de caldo simples e, após a homogeneização, semeada em duas garrafas de Roux com ágar simples suplementado de 1% de glicose, posteriormente incubadas durante 18 horas.
- c - A cultura obtida foi removida com 20 ml de água fisiológica

ca e centrifugada a 3000 rpm, durante 30 minutos.

- d - Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 10 ml de água fisiológica formolada a 0.3% e armazenado a + 4°C.

4.7.4. Antígeno E ou esporos

Os esporos de B. thuringiensis, imunologicamente semelhantes aos cristais parasporais, foram assim obtidos:

- a - Uma alíquota da cultura de B. thuringiensis mantida em ágar simples foi transferida com uma alça de platina para 5 ml de caldo simples, de modo a se obter uma suspensão bastante homogênea e a partir da qual foram semeadas, com pipeta Pasteur, duas garrafas de Roux com ágar simples, in cubadas durante 48 horas.
- b - A cultura obtida foi removida com 10 ml de água fisiológica formolada a 0.3% e armazenada a + 4°C.

4.7.5. Determinação da concentração dos antígenos

A concentração dos antígenos H, O, K e E foi determinada por meio da escala de McFarland. Esta escala consiste numa série de dez tubos de diâmetro uniforme, contendo 0.1, 0.2, 0.3, etc 1.0 ml de uma solução de cloreto de bário a 1% e cujo volume é completado a 10 ml com um soluto de ácido sulfúrico a 1%. Obtém-se, assim, uma série de suspensões de turvação crescente, correspondente à quantidade de sulfato de bário formada.

A concentração de bactérias (em milhões por ml) correspondente a cada tubo foi determinada para os estáfilo e estreptococos, neissérias, enterobacteriáceas, etc. Assim, por exemplo, uma cultura com turvação correspondente ao tubo 3 da escala apresenta um número aproximado de 900 milhões por ml, que, para facilidade de cálculo, pode ser arredondado para 1 bilhão por ml.

A concentração de cada um dos antígenos, obtidos pelas diferentes condições citadas anteriormente, foi determinada através da correspondência com o tubo 3 da escala de McFarland e está expressa na tabela 2.

Tabela 2. Concentração das suspensões de antígenos de B. thuringiensis var. kurstaki.

Antígeno	Concentração de microrganismos (bilhões por ml)
H ou flagelar	20
O ou somático	40
K ou capsular	100
E ou esporos	40

4.7.6. Mistura dos antígenos

Cada antígeno foi diluído em 10 ml de solução fisiológica, de modo a se obter uma suspensão com concentração

correspondente a 2 bilhões de bactérias por ml. O "pool" de antígenos foi constituído por partes iguais de cada uma das quatro suspensões, apresentando, deste modo, também uma concentração correspondente a 2 bilhões de bactérias por ml (LE MINOR, 1960).

Para as injeções subcutâneas e intramuscular, 0.5 ml do "pool" de antígenos foi incorporado a 0.5 ml de adjuvante incompleto de Freund (Difco-Código 0639), passando o inóculo a ter uma concentração correspondente a 1 bilhão de bactérias por ml. Esta mistura foi emulsionada até ficar estável e em perfeito estado coloidal. O adjuvante incompleto de Freund, constituído por uma mistura de Arlacel A e Bayol F, aumenta a imunogenicidade mediante um mecanismo tríplice: a) ação de depósito, retardando a absorção do antígeno; b) formação local de um granuloma rico em células imunocompetentes; c) ação à distância nos órgãos formadores de anticorpos (linfonodos, baço) (BIER, 1975).

Para as injeções endovenosas, o "pool" de antígenos foi diluído dez vezes em água fisiológica, a fim de ser injetada uma suspensão com concentração correspondente a 200 milhões de bactérias por ml.

4.8. Preparação do imunessoro

4.8.1. Imunização

Para a imunização foram utilizados dois coelhos

jovens e adultos, previamente adaptados ao ambiente, cujos soros foram antes examinados, mediante reação de aglutinação rápida em lâmina e reação de imunodifusão dupla radial (OUCHTERLONY, 1970), quanto à presença de anticorpos contra B. thuringiensis var. kurstaki.

Constatada a ausência de tais anticorpos, os animais foram inoculados conforme o esquema adotado por STANBRIDGE e HAYFLICK (1967), a saber:

a - O primeiro inóculo consistiu de uma mistura de 0.5 ml de antígeno e 0.5 ml de adjuvante incompleto de Freund, injetada subcutaneamente em volumes de 0.1 ml em dez pontos diferentes do dorso dos animais. Além disso, 1.0 ml de antígeno foi inoculado endovenosamente na veia marginal da orelha.

As injeções endovenosas causam a formação de anticorpos humorais, enquanto que as injeções subcutâneas (que levam a um depósito focal no tecido linfóide periférico) conduzem ao desenvolvimento da sensibilidade celular (SELL, 1977).

b - Um mês mais tarde e novamente duas semanas após esta data, 1.0 ml de antígeno foi injetado endovenosamente.

c - Oito semanas após a primeira inoculação, um inóculo final de 0.5 ml de antígeno misturado com 0.5 ml de adjuvante incompleto de Freund foi injetado no músculo da coxa, além de 1.0 ml de antígeno injetado endovenosamente.

4.8.2. Sangria de prova

Três dias antes da última injeção foi feita uma

sangria de prova. Os animais foram sangrados na veia marginal da orelha e o sangue obtido, após descolamento do coágulo, foi colocado na estufa a 37°C por 30 minutos, para transudação do soro. Os soros foram, então, separados dos elementos figurados e centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos. O título de aglutininas (anticorpos com capacidade aglutinante) antibacterianas presentes em cada soro foi determinado através de uma reação de aglutinação lenta em tubo, por diluição em série do soro em água fisiológica:

- a - A cada uma de quatro séries de 11 tubos, adicionou-se ao primeiro tubo 0.9 ml e, aos demais, 0.5 ml de água fisiológica fenicada a 0.5%.
- b - Ao primeiro tubo, juntou-se 0.1 ml de soro (diluição 1/10).
- c - Misturou-se bem e passou-se 0.5 ml do 1º tubo para o 2º.
- d - Misturou-se bem e passou-se 0.5 ml do 2º para o 3º tubo e, assim por diante, até chegar ao 10º tubo. A última porção de 0.5 ml foi desprezada e o 11º tubo, contendo apenas água fisiológica fenicada a 0.5%, serviu como controle.
- e - Em cada série, adicionou-se a todos os tubos 0.5 ml de um dos antígenos (turvação igual ao tubo 3 da escala de McFarland). As diluições sucessivas, assim preparadas, correspondem a 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120 e 1/10240.
- f - Misturou-se bem e incubou-se na estufa a 37°C por 24 horas.

A diluição mais alta que mostrou aglutinação foi 1/10240, em ambos os soros, indicando que o título dos mesmos estava em torno desse valor.

4.8.3. Sangria definitiva

Treze dias após a última inoculação, os animais foram sangrados através de uma secção com bisturi da artéria localizada na virilha. O sangue foi coletado diretamente num frasco estéril de boca larga, tendo sido o seu rendimento de aproximadamente 100 ml. Após a coagulação, o coágulo foi descolado e, logo a seguir, o sangue foi incubado a 37°C por 30 minutos. O soro obtido, aproximadamente 50 ml, foi centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos, resultando um sobrenadante límpido, livre de hemólise.

A titulação final dos soros obtidos (I e II) foi feita segundo o método descrito no subcapítulo 4.8.2.

Para facilitar a execução das reações sorológicas, os soros (I e II) foram misturados em partes iguais e esta mistura foi distribuída em quantidades de 2 ml em frascos tipo penicilina, sendo a seguir liofilizada num aparelho "Pirani Type Vacuum Gauge Model 8/1 (Edwards High Vacuum Ltd - England)".

O soro liofilizado foi conservado a -10°C até a utilização, quando, então, a mistura foi redissolvida em 2 ml de água fisiológica e preservada com mertiolato a 1/10000. O

preservante não deve ser adicionado antes da liofilização para não degradar os anticorpos.

Foi feita, então, a titulação final do soro liofilizado frente aos antígenos empregados na imunização. Os títulos do soro, antes e após a liofilização, são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Título do soro anti - B. thuringiensis var. kurstaki, antes e após a liofilização.

Antígeno	Título		
	Imunossoros não liofilizados		Mistura liofilizada dos imunossoros
	I	II	
H ou flagelar	1/20480	1/10240	1/20480
O ou somático	1/1280	1/5120	1/1280
K ou capsular	1/20480	1/20480	1/10240
E ou esporo	1/640	1/20480	1/5120

4.9. Diagnóstico de B. thuringiensis var. kurstaki

O processamento laboratorial para diagnóstico de B. thuringiensis var. kurstaki está esquematizado na Figura 21.

4.9.1. Material de diagnóstico

Foram examinadas 155 larvas de insetos, pertencentes à ordem Lepidoptera, cuja distribuição quanto à espê-

FIG. 21 - ESQUEMA DO PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA DIAGNÓSTICO DE

B. THURINGIENSIS VAR. KURSTAKI

cie, procedência e condição de letalidade está expressa na tabela 4.

Os materiais para diagnóstico foram conservados a -10°C , até o momento da utilização, quando, então, cada larva foi descongelada naturalmente, pesada, picada finamente com uma tesoura e triturada num graal estéril.

4.9.2. Isolamento de B. thuringiensis var. kurstaki

Uma alíquota do triturado de cada larva foi colhida com uma alça de platina e semeada com espátula de Drigalski em uma placa com ágar simples, de modo a se obter colônias isoladas. Após um período de incubação de 18-24 horas, dentre a flora microbiana de surtida, foram selecionadas macroscopicamente as colônias suspeitas de B. thuringiensis (Figura 22).

Dentre estas colônias, uma foi selecionada e ressemeada em uma placa com ágar simples, incubada, a seguir, por 24 horas. A partir desta cultura, foi feito um exame bacteriológico pelo método de coloração de Gram para constatar a morfologia bacteriana típica e o estado de pureza do cultivo.

4.9.3. Reação de aglutinação rápida em lâmina

Nas reações de aglutinação, os antígenos se apresentam sob a forma de partículas e, geralmente, consistem de suspensões de microrganismos. Quando misturados com o so-

Tabela 4. Distribuição do número de larvas de insetos examinadas, quanto à espécie, procedência e condição de letalidade.

Espécie	Procedência				Sub-total
	Campo		Criação artificial		
	Condição de letalidade		Condição de letalidade		
	Espontânea		Espontânea	Induzida por infecção experimental	
<u>Anticarsia gemmatalis</u> Hueb (Lepidoptera, Noctuidae)	1				1
<u>Bombyx mori</u> (L.) (Lepidoptera, Bombycidae)			49	47	96
<u>Brassolis sophorae</u> (L.) (Lepidoptera, Brassolidae)	1		7	38	46
<u>Cirphis latiuscula</u> (Herr.-Sch.) (Lepidoptera, Noctuidae)	1				1
<u>Galleria mellonella</u> L. (Lepidoptera, Pyralidae)			8		8
larva de Lepidoptera (espécie não identificada)	3				3
Sub-total	6		64	85	155
					110

Fig. 22 - Flora bacteriana resultante da sementeira do triturado de uma larva de inseto em ágar simples. As setas indicam colônias dotadas de caracteres morfológicos do B. thuringiensis. Escala 1:1.

ro específico, estas células ou partículas se agregam, formando grumos que aumentam de tamanho, tornam-se visíveis e, finalmente, sedimentam, deixando um sobrenadante claro. Se um dos reagentes é conhecido, a reação pode ser utilizada, seja para identificação do antígeno, seja para identificação do anticorpo. Assim, a reação pode ser usada na identificação, por meio de um imunossoro conhecido, dos microrganismos isolados de uma larva de inseto.

A partir da cultura pura da estirpe em ágar sim

ples, uma colônia isolada foi emulsionada com a alça de platina em duas gotas de água fisiológica, colocadas em posição oposta sobre uma lâmina de vidro bem limpa. Uma gota de soro anti-B. thuringiensis var. kurstaki foi colocada sobre apenas uma das emulsões, passando a outra emulsão a ser, consequentemente, um controle negativo. Após a movimentação adequada da lâmina e decorridos 15-60 segundos, o aparecimento de aglutinação através da reação antígeno-anticorpo indicou a presença de B. thuringiensis var. kurstaki (Figura 23).

Fig. 23 - Reação de aglutinação rápida em lâmina: à direita, uma reação positiva para B. thuringiensis var. kurstaki; à esquerda, controle negativo. Escala 1.5:1.

4.9.4. Teste de toxicidade da estirpe de B. thuringiensis var. kurstaki isolada (processo toxi-infeccioso)

Para se poder afirmar que um microrganismo é o agente de uma infecção, é necessário o preenchimento de uma sé

rie de condições que foram nitidamente estabelecidas nos primórdios da Bacteriologia por Koch e que se designam comumente com a expressão postulados de Koch.

Estes postulados, aplicáveis à Patologia de Insetos, podem ser formulados da maneira seguinte:

- a - O microrganismo deve ser encontrado em todos os casos da doença, em particular nos pontos em que há lesões.
- b - Deve ser possível cultivá-lo fora do corpo do hospedeiro e mantê-lo em cultura pura durante várias gerações.
- c - Com a cultura isolada, deve-se poder reproduzir a doença em animal suscetível.

A cultura pura da estirpe foi semeada em um tubo com ágar simples enriquecido com 1% de glicose e, a seguir, incubada durante 96 horas, tempo suficiente para a esporulação e consequente liberação da δ - endotoxina. A glicose incorporada ao meio de cultura é utilizada como fonte energética de carbono, ocasionando ligeira acidificação do meio, o que propicia a esporulação do microrganismo e produção de δ - endotoxina não ionizada.

Em seguida, parte do induto bacteriano foi retirado com uma alça de platina, ressuspendido em uma gota de água destilada estéril e distendido sobre um fragmento retangular de folha de amoreira, medindo 2 x 3 cm. A preparação, assim obtida, foi oferecida a duas larvas de 2º Ínstar de Bombyx

mori, deixadas previamente em jejum por 24 horas.

Constatada a morte dos insetos e a partir de um triturado dos mesmos, procedeu-se ao reisolamento da estirpe em ágar simples, comprovando, deste modo, sua toxicidade.

Convém ressaltar que a patogenicidade do B. thuringiensis deveria ter sido reproduzida na mesma espécie de inseto, a partir da qual o agente patogênico foi isolado. Entretanto, dada a equivalência de suscetibilidade das diferentes espécies de lepidópteros ao referido microrganismo, a autora optou pelo emprego de B. mori, devido à alta letalidade ocasionada nesta espécie pelo B. thuringiensis e à facilidade de sua criação em laboratório, o que não ocorreu com as outras espécies de insetos examinadas.

4.9.5. Reação de precipitação

A presença do anticorpo contra um antígeno em solução pode ser demonstrada, estratificando-se, em um tubo, o antígeno sobre um pequeno volume de imunessoro. Na interface dos dois reagentes ocorrerá uma reação, evidenciada pela formação de um anel de precipitação (reação de Ascoli). Isto evidencia, de modo qualitativo, uma reação antígeno-anticorpo, mas não indica se estão presentes um, ou vários sistemas antígeno-anticorpo.

No entanto, se a reação é feita em um meio semi-

sólido (por exemplo, gel mole de ágar), os diversos antígenos e anticorpos tendem a se difundir em velocidades diferentes. Como resultado, as proporções ótimas de reação ocorrem em locais diferentes no ágar, formando-se, deste modo, múltiplas linhas distintas de precipitação. Métodos de difusão em ágar, baseados neste princípio (Ouchterlony), ajudam a determinação do número de componentes em misturas de antígenos, assim como, permitem a definição da identidade ou diversidade de diferentes antígenos, quando testados contra um único anticorpo, e vice-versa.

Para o diagnóstico sorológico de B. thuringiensis var. kurstaki, através de reação de precipitação, foram preparados extratos de larvas de insetos, segundo a técnica seguinte:

- a - para cada 3g de larva de inseto, picada finamente com uma tesoura e triturada num graal estéril, foi adicionado 1 ml de água destilada estéril. Esta proporção (p/v) foi antecipadamente determinada como adequada à equivalência com uma diluição de 1/10 (v/v) do imunossoro específico.
- b - Este triturado foi transferido para um tubo de ensaio estéril e fervido, em banho-maria, durante dez minutos, a fim de coagular as proteínas.
- c - O extrato, assim obtido, foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos, e o sobrenadante passado para outro tubo de ensaio estéril.

4.9.5.1. Reação de precipitação em tubo do tipo reação de Ascoli

A reação de Ascoli é um teste sorológico de grande importância no diagnóstico do carbúnculo. É uma reação específica e depende da precipitação de componentes antigênicos do B. anthracis, de natureza polissacarídica, que impregnam os tecidos do animal carbunculoso (BIER, 1975).

Dada a relação íntima existente entre o B. thuringiensis e o B. anthracis, em seus aspectos morfológicos, bioquímicos e sorológicos, é possível utilizar a reação de Ascoli no diagnóstico do bio-inseticida em larvas de insetos.

Para tanto, aproximadamente 0.5 ml do extrato perfeitamente límpido, obtido a partir de uma larva de inseto segundo a técnica descrita no subcapítulo 4.9.5., foi adicionado a um tubo fino de precipitação, contendo o mesmo volume de soro anti-B. thuringiensis var. kurstaki (precipitante). Esperou-se 5-10 minutos e verificou-se se havia formação de um anel de precipitação na interface entre o extrato e o soro, o que indicava uma reação positiva. Foi feito também um controle com extrato de larva normal, que deu resultado negativo (Figura 24).

Este tipo de reação sorológica foi ensaiado experimentalmente para um diagnóstico rápido de triagem. Contudo, dado o grande consumo de imunossoro, o diagnóstico sorológico

Fig. 24 - Reação de precipitação em tubo: à esquerda, reação positiva para B. thuringiensis var. kurstaki; à direita, controle negativo.
Escala 1,75:1.

gico foi realizado através da reação de imunodifusão dupla radial.

4.9.5.2. Reação de imunodifusão dupla radial (método de Ouchterlony)

A reação de imunodifusão dupla radial (OUCHTERLONY, 1970) tem a grande vantagem de permitir a comparação simultânea de muitos sistemas antigênicos contra um mesmo sistema de anticorpos, formando vários padrões que indicam a existência de determinantes comuns nos sistemas comparados.

De acordo com esta técnica, antígeno e anticorpo são colocados separadamente em pequenos orifícios próximos escavados numa camada de gel sobre uma placa de Petri ou lâmina, de onde eles se difundem e se aproximam. Uma linha de precipitação forma-se onde o anticorpo e o antígeno se encontram nas concentrações correspondentes à zona de equivalência. Se a concentração do antígeno for relativamente maior que a do anticorpo, a linha de precipitina aparece mais próxima do orifício que contém o antígeno; se as concentrações forem iguais, a linha aparece no meio do caminho entre os orifícios que contém o anticorpo e o antígeno; se a concentração do anticorpo for maior que a do antígeno, a linha de precipitação aparece mais próxima do orifício do anticorpo (SELL, 1977).

Considerando-se que o antígeno e o imunossoro são colocados em concentrações molares idênticas, a velocidade

de difusão vai depender do peso molecular (PM), isto é, do coeficiente de difusão, respectivamente, do anticorpo e do antígeno. A curvatura estará dirigida sempre para o orifício em que se encontra a substância de maior PM, nas condições ideais de reação (FERRI et alii, 1979).

No presente trabalho, para o diagnóstico de B. thuringiensis var. kurstaki, a reação de imunodifusão dupla radial foi feita em placas contendo 17 ml de agarose tamponada pH 8.6 (CARVALHO JR. et alii, 1976), cuja técnica de preparo foi a seguinte:

Solução A - 0.9 g de ácido bórico foram dissolvidas em 50 ml de água desmineralizada; o pH foi ajustado a 8.6 com hidróxido de sódio 1N ao potenciômetro e a solução foi distribuída em frascos tipo penicilina.

Solução B - 0.6 g de "Agarose type II (Sigma Chemical Company Nº A-6877)" foram suspensas em 50 ml de água desmineralizada; a fusão foi feita a 100°C, durante 15 minutos, e, após o resfriamento em torno de 50-55°C, a solução foi distribuída em frascos tipo penicilina.

A seguir, ambas as soluções foram esterilizadas a 100°C, durante 30 minutos. Tanto A como B foram conservadas ao abrigo da luz, na geladeira a +4°C. No momento do uso, a agarose (B) foi fundida em banho-maria fervente e, enquanto quente, juntada ao tampão borato (A), previamente aquecido a 45°C. Após a adição de 1/10000 de mertiolato, a agarose tam

ponada foi distribuída em placas.

Depois de solidificado o gel de imunodifusão, a placa foi colocada na geladeira a $+4^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos, para a agarose tamponada adquirir mais consistência. A seguir, esta preparação foi perfurada com um molde adequado, resultando um arranjo de orifícios com 8 mm de diâmetro, constituído por um furo central e seis furos periféricos, estes últimos distantes 3 mm do primeiro.

As cavidades foram preenchidas cuidadosamente, de modo que os reagentes atingissem o nível da superfície horizontal da agarose tamponada contida em placa. A técnica de preenchimento obedeceu à norma esquematizada na Figura 25.

- a - soro anti-B. thuringiensis var. kurstaki, diluído 1/10
- b - extrato de larva normal (controle negativo)
- c,d,f,g - extratos de larvas suspeitas de B. thuringiensis var. kurstaki
- e - extrato de larva atacada por B. thuringiensis var. kurstaki (controle positivo).

Fig. 25 - Esquema representativo da disposição de um sistema antígeno- anticorpo, numa reação de imunodifusão dupla radial, para diagnóstico de B. thuringiensis var. kurstaki. Escala 2:1.

As placas foram mantidas, à temperatura ambiente, numa atmosfera úmida, a fim de minimizar os distúrbios de-

vidos à evaporação e deixadas difundir durante 24-48 horas para a formação das linhas de precipitação, indicativas de um diagnóstico positivo de B. thuringiensis var. kurstaki (Figura 26).

Fig. 26 - Reação sorológica de imunodifusão dupla radial: ab, ac, ae, af - linhas de precipitinas, indicando uma reação positiva de precipitação para B. thuringiensis var. kurstaki; ad - linha de precipitina correspondente ao controle positivo; ag - ausência de linha de precipitina, correspondente ao controle negativo. Escala 2:1.

5. RESULTADOS

A aplicação dos recursos descritos no subcapítulo 4.9. tornou possível diagnosticar B. thuringiensis em 54 das 155 larvas de inseto examinadas.

Foi constatada a ocorrência de microrganismos do gênero Bacillus em 6 materiais, 5 dos quais apresentaram falsa reação positiva na aglutinação rápida em lâmina, mas reação negativa através da técnica de imunodifusão dupla radial. O sexto material apresentou resultado negativo nas duas reações sorológicas de diagnóstico.

Nos 95 materiais restantes, o diagnóstico foi negativo tanto através de cultura "in vitro", como por meio de reações sorológicas.

Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5 - Diagnóstico do gênero Bacillus através de cultura "in vitro" e de B. thuringiensis através de aglutinação rápida em lâmina e de imunodifusão dupla radial.

Número de laivas	Técnica de diagnóstico			Resultado do diag nóstico de <u>B. thuringiensis</u>
	Cultura "in vitro" (gên. <u>Bacillus</u>)	Aglutinação rápida em lâmina (<u>B. thuringiensis</u>)	Imunodifusão dupla radial em placa %	
54	+	+	34.8	+
5	+	(+) <u>a/</u>	3.2	-
1	+	-	0.6	-
95	-	-	61.3	-

a/ falsa reação positiva com o imensoro não diluído.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico de B. thuringiensis é, convencionalmente, feito pelo exame bacteriológico através de isolamento do microrganismo em meios de cultura comuns e sua caracterização em meios especiais.

Há relativa facilidade no isolamento de B. thuringiensis em ágar simples, por se tratar de um microrganismo autotrófico. No entanto, cuidados devem ser tomados com referência a:

a - lavagem da vidraria utilizada com produtos tóxicos que se fixam ao vidro e não podem ser eliminados, por exemplo, a mistura sulfocrômica. Também certos detergentes, apesar de facilitarem a remoção de resíduos, quando não removidos com água em abundância, interferem no metabolismo bacteriano, originando variantes de mesma constituição genética, porém com as estruturas morfológica e antigênica alteradas. Isto acarreta uma série de inconvenientes na identificação dos microrganismos.

b - seleção dos constituintes do meio de cultura. Neste sen-

tido, deve-se ressaltar a importância do ágar bacteriológico com relação à presença de microelementos, entre eles, metais pesados, alcalino-terrosos e halogênios, e, também de agentes inibidores (antibióticos). O ferro interfere no mecanismo de óxido-redução da respiração bacteriana. O excesso de cálcio age impedindo a esporulação do B. thuringiensis, com conseqüente ausência da produção de δ - endotoxina. O bromo e o iodo, mesmo em mínimas quantidades, interferem na proliferação de quase todos os microrganismos.

- c - presença de cloro na água componente do meio de cultura, que, em presença de aminoácidos, dá origem a cloraminas resistentes à autoclavagem e extremamente tóxicas para os microrganismos.
- d - ponto isoelétrico (pH) do meio de cultura: é de importância fundamental porque o excesso de álcalis ou de ácidos conduz a reações de hidrólise dos constituintes, alterando a composição do meio de cultura, sem o que não há possibilidade de conservar as características de que são dotadas as diferentes espécies de microrganismos.
- e - condição de isotonia do meio de cultura: tem papel relevante no metabolismo físico-químico da bactéria, já que em condições desfavoráveis de hipo e hipertonia, representadas por diferenças de pressão osmótica, ocorrem fenômenos deletérios na fisiologia do microrganismo.

Além de outras condições, as anteriormente citadas modificam de modo incisivo o aspecto macroscópico das colônias, resultante do pleomorfismo do microrganismo, com conseqüente ausência de cápsula, cílios, esporulação e produção de

cristais parasporais. Desta forma, o bioquimismo bacteriano é alterado e, seguramente também, a estrutura antigênica e a patogenicidade; apesar disto, a constituição genética é mantida. Tendo em vista o exposto, o pesquisador seria induzido a uma falsa interpretação dos resultados da cultura de B. thuringiensis.

O aspecto macroscópico das colônias de B. thuringiensis é uma condição que não possibilita a identificação do agente ao nível de espécie, permitindo apenas uma triagem seletiva do patógeno. Daí, a necessidade de recorrer à investigação de seus caracteres bioquímicos, mediante a utilização convencional de várias reações que distinguem a espécie em questão de outras espécies correlatas.

Frente aos resultados de diagnóstico positivo (34.8% dos materiais examinados), teria sido de bom alvitre distinguir bioquimicamente as estirpes de B. thuringiensis isoladas, através dos meios de cultura especiais utilizados na caracterização da estirpe padrão empregada como antígeno no presente estudo. Todavia, este recurso apresenta certos inconvenientes, dentre eles: ser dispendioso por envolver a manipulação dos vários meios referidos no subcapítulo 4.6. para o estudo das 17 reações bioquímicas citadas no subcapítulo 4.5, e exigir um longo prazo para a leitura dos resultados que pode se estender até 30 dias. Estas são as razões pelas quais a identificação bioquímica não foi incluída no diagnóstico bacterio-

lógico de B. thuringiensis.

Fundamentando-se no fato do cristal proteico de B. thuringiensis só ser ionizado em pH alcalino, foi incluída na série bioquímica, adotada no presente estudo, uma reação para investigar a possibilidade da bactéria produzir uma enzima capaz de alterar "in vivo" as condições desfavoráveis à ativação de sua δ - endotoxina. Esta hipótese foi confirmada através do desdobramento da carbodiamida pelo B. thuringiensis no meio de Uréia Stuart. Tal comportamento conduziu à idéia de que o microrganismo produz uma substância semelhante à urease, que agiria sobre a uréia, alcalinizando o meio.

Consagradamente, as reações sorológicas têm sido empregadas com sucesso para identificar os antígenos característicos de um microrganismo quando se conhece o anticorpo e para determinar a presença de anticorpos no soro do homem ou de um animal quando se utiliza um antígeno conhecido. Este êxito está fundamentado na sua fácil execução prática, seu baixo custo em relação à série bioquímica e no valor específico de seus resultados e rapidez para consecução dos mesmos. Assim, enquanto que a identificação bioquímica do B. thuringiensis atinge o nível de espécie, pelas reações sorológicas pode-se identificá-lo ao nível de variedade. As reações antígeno-anticorpo permitem, desta forma, a identificação definitiva de um

agente patogênico isolado de uma larva de inseto infectada.

Para a obtenção de um soro hiperimune é necessário o conhecimento da estrutura antigênica do microrganismo utilizado para a imunização. Deve ser lembrado que os microrganismos possuem, geralmente, um número variado de antígenos e que os anticorpos, para um ou mais destes, podem estar presentes no imunossoro.

No caso do B. thuringiensis, esta bactéria, na forma vegetativa, é dotada de três antígenos: O ou somático, K ou capsular e H ou flagelar. Este último tem sido utilizado na classificação sistemática da espécie citada, ao nível de variedade (DE BARJAC e BONNEFOI, 1962). Entretanto, o antígeno H não está presente nas formas atríquias de B. thuringiensis (GORDON et alii, 1973), portadoras apenas dos antígenos O e K e que não reagem com um soro hiperimune onde estão presentes apenas anticorpos contra o antígeno flagelar.

Como foi evidenciado por OHBA e AIZAWA (1978), o antígeno H de B. thuringiensis está também presente nas formas vegetativas de bactérias esporuladas acristalíferas, morfológicamente relacionadas com o B. cereus. Este microrganismo está amplamente distribuído na natureza, podendo ser isolado com certa frequência da flora microbiana dos insetos e, em consequência, ser o responsável por falsos resultados positivos de diagnóstico do B. thuringiensis.

Os principais tipos de reações sorológicas incluem a aglutinação lenta e rápida, precipitação em tubo, imunodifusão simples em tubo, imunodifusão dupla em placa, imunodifusão simples radial, imunoeletroforese, hemaglutinação, fixação do complemento e imunofluorescência direta e indireta.

No desenvolvimento deste trabalho, a reação de precipitação em tubo foi apenas ensaiada experimentalmente, para constatar a eficiência do método. O diagnóstico de B. thuringiensis foi executado mediante duas reações de antígeno-anticorpo específicos:

a - Reação de aglutinação rápida em lâmina: foi empregada por permitir uma leitura rápida num diagnóstico de triagem.

A utilização do soro puro pode conduzir a falsas reações positivas, evidenciadas em 3.2% das larvas examinadas. Seguramente, este resultado advém da presença de anticorpos inespecíficos, normalmente presentes em baixo título no soro normal do animal injetado e não detectados na pesquisa de anticorpos anterior às inoculações. Durante a imunização, o sistema imunitário é ativado, elevando o título de tais anticorpos, razão pela qual há necessidade de diluição do imunossoro, a fim de determinar o título ótimo para aglutinação específica.

Em 0.6% dos materiais diagnosticados, ocorreram colônias com morfologia macroscópica suspeita (gênero Bacillus),

semelhantes às de B. subtilis e cuja identidade sorológica foi negativa nas reações sorológicas frente ao soro anti-B. thuringiensis var. kurstaki.

- b - Reação de imunodifusão dupla radial em placa (método de Ouchterlony): foi utilizada por conferir resultados mais específicos e por, inclusive, definir o número de frações antigênicas do microrganismo, evidenciáveis através das linhas de precipitação.

Várias fórmulas à base de gel de ágar foram ensaiadas no diagnóstico através deste tipo de reação sorológica e a que mostrou maior eficiência foi o gel de ágar tamponado desenvolvido por CARVALHO et alii (1976).

Dada a variação da qualidade do ágar, como matéria prima, houve a substituição deste por um polissacáride purificado, designado agarose. Três lotes diferentes da referida substância foram utilizados, com comportamento eficaz e constância nos resultados obtidos.

As demais substâncias, empregadas no preparo da agarose tamponada, devem ser pró-análise (P.A.), caso contrário, a presença de impurezas pode dificultar a imunodifusão.

O diagnóstico positivo de B. thuringiensis foi observado em 34.8% dos casos suspeitos, através de aglutinação rápida em lâmina e de imunodifusão dupla radial. A patogenicidade das estirpes correspondentes, isoladas em ágar simples,

foi comprovada nos testes de toxi-infecção, satisfazendo plenamente os postulados de Koch e confirmando a eficiência das reações sorológicas empregadas no diagnóstico do agente patogênico.

A fim de aperfeiçoar e complementar a eficiência e especificidade do diagnóstico sorológico de B. thuringiensis em larvas de insetos, é imprescindível estender o presente estudo através de futuras pesquisas sobre:

- a - a possibilidade de utilização de outras reações sorológicas, além das utilizadas nesta tese, no diagnóstico de B. thuringiensis.
- b - o estudo isolado dos vários antígenos inerentes ao B. thuringiensis, a fim de selecionar qual o que confere maior especificidade ao diagnóstico sorológico.
- c - a afinidade cromológica dos microcristais parasporais de B. thuringiensis, a fim de elucidar a coloração, obtida por meio de um artifício de técnica, da δ - endotoxina produzida pelas culturas do microrganismo. Verificar a possibilidade de utilizar este recurso na complementação do diagnóstico citobacterioscópico de B. thuringiensis na fase esporulada.

7. CONCLUSÕES

Tendo em vista o objetivo proposto na presente tese, a discussão dos resultados, obtidos através do processamento laboratorial descrito no capítulo MATERIAL E MÉTODOS , permitiu concluir que:

- 7.1. - É possível diagnosticar B. thuringiensis em larvas de insetos, através de reações sorológicas específicas.
- 7.2. - A reação sorológica de aglutinação rápida em lâmina é aconselhável apenas para um diagnóstico rápido de triagem do B. thuringiensis.
- 7.3. - A reação sorológica de imunodifusão dupla radial fornece resultados de diagnóstico do B. thuringiensis, mais rápidos, mais específicos e de menor custo em relação à identificação bioquímica.
- 7.4. - As reações sorológicas para diagnóstico do B. thuringiensis devem ser executadas com um imunossoro obtido contra

um ou mais antígenos de maior especificidade que o antígeno flagelar.

8. SUMMARY

The possibility of utilizing serological reactions was investigated in order to make Bacillus thuringiensis diagnosis in insect larvae including beneficial species, vectors of maladies and pests more practical and specific.

For the preparation of antiserum, rabbits were immunized with flagellar, somatic, capsule and spore antigens from a previously characterized strain of B. thuringiensis var. kurstaki (serotype III), isolated from a commercial formulation.

The presence of Gram-positive, peritrichously flagellated and capsuled vegetative rods was observed through the citobacterioscopic test of a reference strain's culture. Unstained, subterminal and isolated spores, besides dispersed crystals of bipyramidal structure similar to B. thuringiensis δ - endotoxin were detected by means of a device used in Gram's stain.

Regarding the cultural aspects, the microorganisms originated swarming and rough colonies on nutrient agar. Colo-

nies upon blood agar exhibited a distinct zone of hemolysis.

The biochemical series employed conventionally for identifying B. thuringiensis were complemented with a reaction of urea hydrolysis employing Stuart's urea medium.

B. thuringiensis diagnosis through a slide agglutination test and radial double immunodiffusion in plate was carried out in 155 Lepidoptera insect larvae. It could be noticed that there was an occurrence of bacteria morphologically belonging to the genus Bacillus in 3.8% of the cases and the incidence of B. thuringiensis in 34.8% of the examined materials.

The efficiency of serological reactions was proved by determining the qualitative toxicity of B. thuringiensis isolates.

The results obtained lead us to conclude that :
1 - it is possible to use specific serological reactions for the diagnosis of B. thuringiensis in insect larvae; 2 - the slide agglutination test is suitable only for a B. thuringiensis rapid screening diagnosis; 3 - the radial double immunodiffusion in plate gives faster, more specific and cheaper results of B. thuringiensis diagnosis, in relation to the biochemical identification; 4 - the serological reactions for B. thuringiensis diagnosis must be done with an antiserum against one or more antigens, more specific than the flagellar antigen.

9. LITERATURA CITADA

ANGUS, T.A., 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature, Lond. London, 173: 545.

ANGUS, T.A., 1956a. Extraction, purification and properties of Bacillus sotto toxin. Can.J. Microbiol. Ottawa, 2 : 416-426.

ANGUS, T.A., 1956b. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of Bacillus sotto ishiwata. Can.J. Microbiol. Ottawa, 2: 122-131.

ANGUS, T.A. e A.M. HEIMPEL, 1959. Inhibition of feeding and blood pH changes in lepidopterous larvae infected with crystal-forming bacteria. Can. Ent. Ontario, 91:352-358.

ARONSON, A.I., 1965. Membrane-bound Messenger RNA and Polysomes in Sporulating Bacteria. J. molec. Biol. London, New York, 13: 92-104.

ARONSON, A.I. e P.C. FITZ-JAMES, 1968. Biosynthesis of Bacterial Spore Coats. J. molec. Biol. London, New York, 33: 199-212.

- BEEBEE, T., A. KORNER e R.P.M. BOND, 1972. Differential Inhibition of Mammalian Ribonucleic Acid Polymerases by an Exotoxin from Bacillus thuringiensis. Biochem. J. Liverpool, Cambridge, 127: 619-624.
- BENZ, G., 1966. Die Pufferkapazität Von Blut und Verdauungssaft von Pieris brassicae und der Einfluss von Anoxie und Bacillus thuringiensis endotoxin auf die permeabilität der Darmwand. J. Insect. Physiol. London, 12: 137-151.
- BERLINER, E., 1915. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella Zell) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis n. sp. Z. angew. Ent. Berlin, 2: 29-56.
- BIER, O., 1942. Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações à medicina e à higiene. 1a. ed. São Paulo, Edições Melhoramentos. 608 p.
- BIER, O., 1975. Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações à medicina e à higiene. 16a. ed. São Paulo, Edições Melhoramentos. 1056 p.
- BOND, R.P.M., C.B.C. BOYCE e S.J. FRENCH, 1969. A purification and some Properties of an Insecticidal Exotoxin from Bacillus thuringiensis Berliner. Biochem. J. Liverpool, Cambridge, 114: 477-488.
- BONNEFOI, A. e H. DE BARJAC, 1963. Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga. Paris, 8: 223-229.
- BONNEFOI, A. e S. BÉGUIN, 1959. Recherches sur l'action des cristaux de Bacillus thuringiensis Berliner souche "anduze". Entomophaga. Paris, 4: 193-199.

- BRIGGS, J.D., 1963. Commercial production of insect pathogens. In: STEINHAUS, E.A., Ed. Insect Pathology. New York, Academic Press, vol. 2, p. 519-548.
- BROERSMA, D.B. e J.A. BUXTON, 1967. A Comparative Study of the Action of Six Crystalliferous Bacteria on the Cabbage Looper, Trichoplusia ni. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 58-69.
- BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. ed. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins. 1268 p.
- BUCHER, G.E., T.A. ANGUS e J. KRYWIENCZYK, 1966. Characteristics of a New Strain of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner (Serotype I) Isolated from the Bumblebee Wax Moth. J. Invertebr. Pathol. New York, 8: 485-491.
- BURGERJON, A., 1965. Le titrage biologique des cristaux de Bacillus thuringiensis Berliner par réduction de consommation au laboratoire de la minière. Entomophaga. Paris, 10: 21-26.
- BURGERJON, A. e H. DE BARJAC, 1960. Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par Bacillus thuringiensis Berliner. C. r. hebdomadaire. Séances Acad. Sci. Paris, 251: 911-912.
- CARVALHO JR., O.M., L.O.C. RIBEIRO e S.B.K. MUELLER, 1976. Levantamento sorológico da anemia infecciosa equina em animais de custeio do Estado de São Paulo através da prova de imunodifusão em gel de ágar. Biológico. São Paulo, 42: 156-163.

- CHU, H.P., 1949. The lecithinase of Bacillus cereus and its comparison with Clostridium welchii α -toxin. J. gen. Microbiol. Cambridge, 3: 255-273.
- COLMER, A.R., 1948. The action of Bacillus cereus and related species on the lecithin complex of egg yolk. J. Bact. Baltimore, 55: 777-785.
- CONNER, R.M. e P.A. HANSEN, 1967. Effects of Valine, Leucine, and Isoleucine on the Growth of Bacillus thuringiensis and Related Bacteria. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 12-18.
- COOKSEY, K.E., 1968. Purification of a Protein from Bacillus thuringiensis Toxic to Larvae of Lepidoptera. Biochem. J. Liverpool, Cambridge, 106: 445-454.
- COOKSEY, K.E., 1971. The Protein Crystal Toxin of Bacillus thuringiensis: Biochemistry and Mode of Action. In: BURGESS, H.D. e N.W. HUSSEY, Ed. Microbial Control of Insects and Mites. New York, Academic, p. 247-274.
- COWAN, S.T. e K.J. STEEL, 1970. Manual for the identification of medical bacteria. 1st. ed. Cambridge, University Press. 217 p.
- DE BARJAC, H., 1978. Un Nouvelle Variete de Bacillus thuringiensis tres toxique pour les moustiques: B. thuringiensis var. israelensis, serotype 14. C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 286: 797-800.
- DE BARJAC, H. e A. BONNEFOI, 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type B. thuringiensis. Entomophaga. Paris, 7: 5-31.

- DE BARJAC, H. e A. BONNEFOI, 1968. A classification of strains of Bacillus thuringiensis Berliner with a key to their differentiation. J. Invertebr. Pathol. New York, 11: 335-347.
- DE BARJAC, H. e F. LEMILLE, 1970. Presence of Flagellar Antigenic Subfactors in Serotype 3 of Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. New York, 15: 139-140.
- DE BARJAC, H. e J.V. THOMPSON, 1970. A New Serotype of Bacillus thuringiensis: B. thuringiensis var. thompsoni (Serotype 11). J. Invertebr. Pathol. New York, 15: 141-144.
- DE BARJAC, H. e M. DEDONDER, 1968. Purification de la toxine thermostable de B. thuringiensis var. thuringiensis et analyses complémentaires. Bull. Soc. Chim. biol. Paris, 50: 941-944.
- DE BARJAC, H. e M.M. LECADET, 1961. Relations immunologiques des protéines toxiques extraites de trois souches de Bacillus thuringiensis. C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 252: 3160-3162.
- DE BARJAC, H. e R. DEDONDER, 1965. Isolement d'un nucléotide identifiable à la "toxine thermostable" de Bacillus thuringiensis var. Berliner. C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 260: 7050-7053.
- DE BARJAC, H., V.C. DUMANOIR, M.R. SHAIKH e G. VIVIANI, 1977. Bacillus thuringiensis var. pakistani: Nouvelle sous-espèce correspondant au serotype 13. C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 284: 2051-2053.
- DELAFIELD, F.P., H.J. SOMERVILLE e S.C. RITTENBERG, 1968. Immunological Homology Between Crystal and Spore Protein of Bacillus thuringiensis. J. Bact. Baltimore, 96: 713-720.

- DELAPORTE, B. e S. BEGUIN, 1955. Étude d'une souche de Bacillus pathogène pour certains insectes identifiable à Bacillus thuringiensis Berliner. Annls. Inst. Pasteur. Paris, 89: 632-643.
- DIFCO LABORATORIES, 1972. Manual of dehydrated culture media and resgents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9th. ed. Detroit, Difco Laboratories. 350 p.
- DULMAGE, H., 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolated of Bacillus thuringiensis var. alesti. J. Invertebr. Pathol. New York, 15: 232-239.
- ESTES, Z.E. e R.M. FAUST, 1964. Studies on the mucopolysaccharides of the greater wax moth, Galleria mellonella. Comp. Biochem. Physiol. London, 13: 443-452.
- ESTES, Z.E. e R.M. FAUST, 1965. A colorimetric method for the determination of silicon in biological materials. Analyt. Biochem. New York, London, 13: 518-522.
- FAST, P.G. e T.A. ANGUS, 1965. Effects of parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis var. sotto Ishiwata on the permeability of the gut wall of Bombyx mori (Linnaeus) larvae. J. Invertebr. Pathol. New York, 7: 29-32.
- FAST, P.G. e T.A. ANGUS, 1970. The δ - Endotoxin of Bacillus thuringiensis var. sotto: A Toxic Low Molecular Weight Fragment. J. Invertebr. Pathol. New York, 16: 465.
- FAUST, R.M., 1968. In Vitro Chemical Reaction of the δ - Endotoxin Produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus with Other Proteins. J. Invertebr. Pathol. New York, 11: 465-475.

- FAUST, R.M., E. DOUGHERTY, A. HEIMPEL e C. REICHELDERFER, 1971a. Standardization of the δ - Endotoxin Produced by Several Varieties of Bacillus thuringiensis. 1. Enzyme Kinetics of the Trypsin - Azoalbumin - δ - Endotoxin System. J. econ. Ent. Geneva, New York, 64: 611-615.
- FAUST, R.M., E. DOUGHERTY, A. HEIMPEL e C. REICHELDERFER, 1971b. Standardization of the δ - Endotoxin Produced by Several Varieties of Bacillus thuringiensis. 2. Enzyme Inhibition (In_{50}) as a Method of Standardizing Commercial Preparations of the δ - Endotoxin. J. econ. Ent. Geneva, New York, 64: 615-621.
- FAUST, R.M., J. ADAMS e A. HEIMPEL, 1967. Dissolution of the Toxic Parasporal Crystals from Bacillus thuringiensis var. pacificus by the Gut Secretions of the Silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 488-499.
- FAUST, R.M. e Z.E. ESTES, 1966. Silicon content of the parasporal crystal of several crystalliferous bacteria. J. Invertebr. Pathol. New York, 8: 141-144.
- FERRI, R.G., V.L.G. CALICH e C.A.C. VAZ, 1979. Imunologia.2a. ed. São Paulo, Artes Médicas. 317 p.
- FITZ-JAMES, P.C., C. TOUMANOFF e E.I. YOUNG, 1958. Localization of a toxicity for silkworm larvae in the parasporal inclusion of Bacillus cereus var. alesti. Can. J. Microbiol. Ottawa, 4: 385-392.
- GERHARDT, P. e E. RIBI, 1964. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of Bacillus cereus. J. Bact. Baltimore, 88: 1774-1789.
- GORDON, R.E., W.C. HAYNES e C.H. - N. PANG, 1973. The Genus Bacillus. Agr. Handb. Nº 427. Washington DC: Agr. Res. Serv., US Dept. Agr. 283 p.
- GRAY, P.H.H., 1926. A method of staining bacterial flagella. J. Bact. Baltimore, 12: 273-274.

- GRIEGO, V.M., D. MOFFETT e K.D. SPENCE, 1979. Inhibition of active K^+ transport in the tobacco hornworm (Manduca sexta) midgut after ingestion of Bacillus thuringiensis endotoxin. J. Insect Physiol. London, 25: 283-288.
- GRIGOROVA, R., E. KANTARDGIEVA e N. PASHOV, 1967. On the Shape and Structure of the Crystal in two Strains of Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. New York, 9:503-509.
- HALL, I.M. e P.H. DUNN, 1958. Susceptibility of some insect pests to infection by Bacillus thuringiensis Berliner in laboratory tests. J. econ. Ent. Geneva, New York, 51:296-298.
- HANNAY, C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, Lond. London, 172: 1004.
- HANNAY, C.L. e P.C. FITZ-JAMES, 1955. The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner. Can. J. Microbiol. Ottawa, 1: 694-710.
- HEIMPEL, A.M., 1955a. The pH in the gut and blood of the larch sawfly Pristiphora erichsonii(Htg) and other insects with reference to the pathogenicity of Bacillus cereus Fr. and Fr. Can. J. Zool. Ottawa, 33: 99-106.
- HEIMPEL, A.M., 1955b. Investigations of the mode of action of strains of Bacillus cereus Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly , Pristiphora erichsonii (Htg). Can. J. Zool. Ottawa, 33: 311-326.
- HEIMPEL, A.M., 1956. Further studies of the pH in the gut and blood of Canadian forest insects. Can. J. Zool. Ottawa , 34: 210-212.

- HEIMPEL, A.M., 1967a. A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria. A. Rev. Ent. Palo Alto, 12: 287-322.
- HEIMPEL, A.M., 1967b. A taxonomic key for crystalliferous bacteria related to Bacillus thuringiensis Berliner. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 364-375.
- HEIMPEL, A.M. e T.A. ANGUS, 1958a. The taxonomy of insect pathogens related to Bacillus cereus Fr. and Fr. Can.J.Microbiol. Ottawa, 4: 531-541.
- HEIMPEL, A.M. e T.A. ANGUS, 1958b. Recent advances in the knowledge of some bacterial pathogens of insects. Proc.Int. Congr. Ent., 10th, Montreal, 1956, 4: 711-722.
- HEIMPEL, A.M. e T.A. ANGUS, 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Path. New York, London, 1: 152-170.
- HEIMPEL, A.M. e T.A. ANGUS, 1960. Bacterial Insecticides. Bact. Rev. Baltimore, 24: 266-288.
- HEINEN, W., 1965. Time dependent distribution of silicon in intact cells and cell-free extracts of Proteus mirabilis as a model of bacterial silicon transport. Archs Biochem. Biophys. New York, 110: 137-149.
- HERBERT, B.H., H.J. GOULD e E.B. CHAIN, 1971. Crystal Protein of Bacillus thuringiensis var. tolworthi. Subunit Structure and Toxicity to Pieris brassicae. Eur. J. Biochem. Berlin, 24: 366-375.
- KRIEG, A., 1969. In vitro determination of Bacillus thuringiensis, Bacillus cereus, and related bacilli. J. Invertebr. Pathol. New York, 15: 313-320.

- KRIEG, A., H. DE BARJAC e A. BONNEFOI, 1968. A New Serotype of Bacillus thuringiensis Isolated in Germany: Bacillus thuringiensis var. darmstadiensis. J. Invertebr. Pathol. New York, 10: 428-430.
- KRIEG, A. e W. HERFS, 1963. Empfindlichkeit verschiedener Insektenarten gegenüber dem "Exotoxin" von Bacillus thuringiensis Berliner. Z. PflKrankh. PflSchutz. Stuttgart, 70: 11-21.
- KRYWIENCZYK, J., H.T. DULMAGE e P.G. FAST, 1978. Occurrence of two serologically distinct groups within Bacillus thuringiensis serotype 3ab var. kurstaki. J. Invertebr. Pathol. New York, 31: 372-375.
- KRYWIENCZYK, J. e T.A. ANGUS, 1967. A serological comparison of several crystalliferous insect pathogens. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 126-128.
- KUSHNER, D.J. e A.M. HEIMPEL, 1957. Lecithinase production by strains of Bacillus cereus Fr. and Fr. pathogenic for the larch sawfly, Pristiphora erichsonii (Htg). Can J. Microbiol. Ottawa, 3: 547-551.
- LABAW, L., 1964. The structure of Bacillus thuringiensis Berliner crystals. J. Ultrastruct. Res. New York, London, 10: 66-75.
- LACEY, L.A. e B.A. FEDERICI, 1979. Pathogenesis and midgut histopathology of Bacillus thuringiensis in Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol. New York, 33: 171-182.

- LECADET, M.M. 1966. La toxine figurée de Bacillus thuringiensis dissolution par action du thioglycolate on de la cystéine. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 262:195-198.
- LECADET, M.M. e D. MARTOURET, 1962. La toxine figurée de Bacillus thuringiensis: Production enzymatique de substances solubles toxiques par injection. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, 254: 2457-2459.
- LECADET, M.M., G. CHEVRIER e R. DEDONDER, 1972. Analysis of a Protein Fraction in the Spore Coats of Bacillus thuringiensis. Eur. J. Biochem. Berlin, 25: 349-358.
- LECADET, M.M. e R. DEDONDER, 1966a. Les protéases de Pieris brassicae. I.- Purification et propriétés. Bull. Soc. Chim. biol. Paris, 48: 631-660.
- LECADET, M.M. e R. DEDONDER, 1966b. Les protéases de Pieris brassicae. II. - Spécificité. Bull. Soc. Chim. biol. Paris, 48: 661-691.
- LECADET, M.M. e R. DEDONDER, 1967. Enzymatic Hydrolysis of the Crystals of Bacillus thuringiensis by the Proteases of Pieris brassicae. I. Preparation and Fractionation of the Lysates. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 310-321.
- LECADET, M.M. e R. DEDONDER, 1971. Biogenesis of the Crystalline Inclusion of Bacillus thuringiensis during Sporulation. Eur. J. Biochem. Berlin, 23: 282-294.
- LECADET, M.M. e R. MARTOURET, 1967. Enzymatic Hydrolysis of the Crystals of Bacillus thuringiensis by the Proteases of Pieris brassicae. II. Toxicity of the Different Fractions of the Hydrolysate for Larvae of Pieris brassicae. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 322-330.

- LE MINOR, L., 1960. Le Diagnostic de Laboratoire des Entéro - bactéries. 3e. ed. St. Mandé, Ed. de la Tourelle. 222 p.
- LYSENKO, O., 1963. The taxonomy of entomogenous bacteria. In: STEINHAUS, E.A., Ed. Insect Pathology: An Advanced Treatise. New York, Academic Press, vol. 2, p. 1-18.
- MARTIN, D.B. e P.R. VAGELOS, 1962. The Mechanism of Tricarboxylic Acid Cycle Regulation of Fatty Acid Synthesis. J. biol. Chem. Baltimore, 237: 1787-1792.
- MARTOURET, D., J. L'HOSTE e A. ROCHE, 1965. Action sur le mé-sentéron de Pieris brassicae L. de la toxine de l'inclusion parasporal de Bacillus thuringiensis. Entomophaga. Paris, 10: 349-365.
- MATTES, O., 1927. Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. Sber. Ges. Beförd. ges. Naturw. Marburg, 62: 381-417.
- MC CONNEL, E. e A.G. RICHARDS, 1959. The production by Bacillus thuringiensis Berliner of a heat stable substance toxic for insects. Can. J. Microbiol. Ottawa, 5: 161-168.
- MONRO, R.E., 1961. Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of Bacillus thuringiensis. Biochem. J. Liverpool, Cambridge, 81: 225-232.
- NICKERSON, K.W., G. ST. JULIAN e L.A. BULLA JR., 1974a. Physiology of Sporeforming Bacteria Associated with Insects: Radiorespirometric Survey of Carbohydrate Metabolism In the 12 Serotypes of Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol. Baltimore, 28: 129-132.

- NICKERSON, K.W., J. DE PINTO e S.A. BULLA JR., 1974b. Sporulation of Bacillus thuringiensis Without Concurrent Depression of the Tricarboxylic Acid Cycle. J. Bact. Baltimore, 117: 321-323.
- NICKERSON, K.W. e L.A. BULLA JR., 1974. Physiology of Spore-forming Bacteria Associated with Insects: Minimal Nutritional Requirements for Growth, Sporulation, and Parasporal Crystal Formation of Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol. Baltimore, 28: 124-128.
- NORRIS, J.R., 1964. The classification of Bacillus thuringiensis. J. appl. Bact. Reading, 27: 439-447.
- NORRIS, J.R., 1974. The Protein Crystal Toxin of Bacillus thuringiensis: Biosynthesis and Physical Structure. In: BURGESS, H.D. e N.W. HUSSEY, Ed. Microbial Control of Insects and Mites. New York, Academic, p. 229-246.
- NORRIS, J.R. e D.H. WATSON, 1960. An Electron Microscope Study of Sporulation and Protein Crystal Formation in Bacillus cereus var. alesti. J. gen. Microbiol. Cambridge, 22: 744-749.
- NORRIS, J.R. e H.D. BURGESS, 1963. Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects; epizootiological applications. J. Insect Pathol. New York, London, 5: 460-472.
- NORRIS, J.R. e H.D. BURGESS, 1965. The identification of Bacillus thuringiensis. Entomophaga. Paris, 10: 41-47.
- OHBA, M. e K. AIZAWA, 1978. Serological Identification of Bacillus thuringiensis and Related Bacteria Isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. New York, 32: 303-309.

- OUCHTERLONY, O., 1970. Handbook of Immunodiffusion and Immuno electrophoresis. 4th. ed. London, Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, Ltd. 215 p.
- PENDLETON, I.R., 1969. Comparative Toxicities of Crystal Sero types of Bacillus thuringiensis for Larvae of Philosamia cynthia var. ricini. J. Invertebr. Pathol. New York, 13: 423-428.
- PENDLETON, I.R., 1970. Sodium and Potassium Fluxes in Philosamia ricini During Bacillus thuringiensis Protein Crystal Intoxication. J. Invertebr. Pathol. New York, 16: 313-314.
- PENDLETON, I.R. e R.B. MORRISON, 1966. Separation of the Spores and Crystals of Bacillus thuringiensis. Nature, Lond. London, 212: 728-729.
- PIDGEN, W., 1963. Hyaluronic acid and factors or tissue permeability. Bull. Soc. Chim. biol. Paris, 45: 185-202.
- RAMAKRISHKMAN, N., 1968. Observations on the Toxicity of Bacillus thuringiensis for the Silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. New York, 10: 449-450.
- REEVES, H.C., R. RABIN, W.S. WEGENER e S.J. AJL, 1967. Fatty acid synthesis and metabolism in microorganisms. A. Rev. Microbiol. Palo Alto, 21: 225-256.
- ROGOFF, M.H. e A.A. YOUSTEN, 1969. Bacillus thuringiensis : Microbiological Considerations. A. Rev. Microbiol. Palo Alto, 23: 357-386.

- SAYLES, V.B., J.N. ARONSON e A. ROSENTHAL, 1970. Small polypeptide components of the Bacillus thuringiensis parasporal crystalline inclusion. Biochem. biophys. Res. Commun. New York, London, 41: 1126-1133.
- SEBESTA, K. e K. HORSKA, 1968. Inhibition of DNA - dependent RNA polymerase by the exotoxin of Bacillus thuringiensis var. gelechia. Biochim. biophys. Acta. New York, Amsterdam, 169: 281-282.
- SEBESTA, K. e K. HORSKA, 1970. Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of Bacillus thuringiensis. Biochim. biophys. Acta. New York, Amsterdam, 209: 357-367.
- SELL, S., 1977. Imunologia, Imunopatologia e Imunidade. 2a.ed. São Paulo, Atheneu Editora. 374 p.
- SINGER, S., N.S. GOODMAN e M.H. ROGOFF, 1966. Defined media for the study of bacilli pathogenic to insects. Ann. N. Y. Acad. Sci. New York, 139: 16-23.
- SMITH, N.R., R.E. GORDON e F.E. CLARK, 1946. Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. Misc. Publs. U. S. Dep. Agric Washington, 559. Re-issued as U.S. Dept. Agr. Monograph . Washington, 16 (1952).
- SOMERVILLE, H.J., 1971. Formation of the Parasporal Inclusion of Bacillus thuringiensis. Eur. J. Biochem. Berlin, 18 : 226-237.
- SOMERVILLE, H.J., F.P. DELAFIELD e S.C. RITTENBERG, 1968. Biochemical Homology Between Crystal and Spore Protein of Bacillus thuringiensis. J. Bact. Baltimore, 96: 721-726.

- SPECTOR, W.G. e D.A. WILLOUGHBY, 1963. The inflammatory response. Bact. Rev. Baltimore, 27: 117-154.
- SPENCER, E., 1968. Comparative Amino Acid Composition of the Parasporal Inclusions of Five Entomogenous Bacteria. J. Invertebr. Pathol. New York, 10: 444-445.
- STANBRIDGE, E. e L. HAYFLICK, 1967. Growth Inhibition Test for Identification of Mycoplasma Species Utilizing Dried Antiserum-Impregnated Paper Discs. J. Bact. Baltimore, 93: 1392-1396.
- STEINHAUS, E.A., 1951. Possible use of Bacillus thuringiensis Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. Hilgardia. Berkeley, 20: 359-381.
- STEINHAUS, E.A. e C.R. BELL, 1953. The effect of certain microorganisms and antibiotics on stored grain insects. J. econ. Ent. Geneva, New York, 46: 582-598.
- STEINHAUS, E.A. e E.A. JERREL, 1954. Further observations on Bacillus thuringiensis Berliner and other sporeforming bacteria. Hilgardia. Berkeley, 23: 1-23.
- STUART, C.A., E. VAN STRATUM e R. RUSTIGIAN, 1945. Further studies on usease production by Proteus and related organisms. J. Bact. Baltimore, 49: 437 444.
- SUTTER, G. e E. RAUN, 1967. Histopathology of European Corn-Borer Larvae Treated with Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol. New York, 9: 90-103.
- TOENNIES, G., 1965. Role of Amino Acids in Postexponential Growth. J. Bact. Baltimore, 90: 438-442.

TOUMANOFF, C., 1952. A propos d'un Bacille pathogène pour les vers à soie au Japan (Bacillus sotto (Ishiwata)) et ses affinités avec d'autres bacilles entomophytes. Annls. Inst. Pasteur. Paris, 82: 512-516.

TOUMANOFF, C., 1953. Description de quelques souches entomophytes de Bacillus cereus Frank. et Frank. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf. Annls. Inst. Pasteur. Paris, 85: 90-99.

TOUMANOFF, C., 1954. L'action de Bacillus cereus var. alesti Toum. et Vago sur les chenilles de Galleria melonella L. and Hyponomeuta cognatella H.B. Annls. Inst. Pasteur. Paris, 86: 570-579.

TOUMANOFF, C. e Y. LE COROLLER, 1959. Contribution à l'étude de Bacillus cereus Frank. et Frank. cristallobactères et pathogènes pour les larves de Lépidoptères. Annls. Inst. Pasteur. Paris, 96: 680-688.

VANKOVÁ, J., 1957. Study of the effect of Bacillus thuringiensis on insects. Folia biol., Praha. Praha, 3: 175-182.

WAITE, M. e S.J. WAKIL, 1962. Studies on the Mechanism of Fatty Acid Synthesis. XII. Acetyl Coenzyme A Carboxylase. J. biol. Chem. Baltimore, 237: 2750-2757.

WAKIL, S.J., J.K. GOLDMAN, I.P. WILLIAMSON e R.J. TOOMEY, 1966. Stimulation of fatty acid biosynthesis by phosphorylated sugars. Proc. natn. Acad. Sci. USA. Washington, 55: 880-887.

- WOLF, J. e A.N. BARKER, 1968. The Genus Bacillus: Aids to the Identification of its Species. In: GIBBS, B.M. e D. A. SHAPTON, Ed. Identification Methods for Microbiologists. New York, Academic Press, Part B, p. 93-109.
- YOUNG, I.E. e P.C. FITZ-JAMES, 1959a. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. III. The effect of azaguanine on spore and parasporal protein formation in Bacillus cereus var. alesti. J. biophys. biochem. Cytol. Baltimore, New York, 6: 499-506.
- YOUNG, I.E. e P.C. FITZ-JAMES, 1959b. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in Bacillus cereus var. alesti. J. biophys. biochem. Cytol. Baltimore, New York, 6: 483 - 498.
- YOUSTEN, A.A. e M.H. ROGOFF, 1969. Metabolism of Bacillus thuringiensis in Relation to Spore and Crystal Formation. J. Bact. Baltimore, 100: 1229-1236.
- YOUSTEN, A.A. e R.S. HANSON, 1972. Sporulation of Tricarboxylic Acid Cycle Mutants of Bacillus subtilis. J. Bact. Baltimore, 109: 886-894.