



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular**

**Avaliação do perfil toxigênico da Coleção
de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de
solo**

Maria Inês André de Magalhães

Brasília
2019

Maria Inês André de Magalhães

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXIGÊNICO DA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS
FORMADORAS DE ENDÓSPOROS ISOLADAS DE SOLO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Patologia
Molecular da Universidade de Brasília para
obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brigido
Co-orientadora: Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza

Brasília
2019

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Ruy e Maria Candida, por todo esforço, incentivo e dedicação incondicional à minha educação, que me fizeram ser a primeira pessoa da família a estudar em uma universidade federal. À minha mãe, professora, pelas jornadas duplas de trabalho, sempre exemplo de dedicação aos estudos e de quem herdei características que me fizeram uma boa cientista. Ao meu pai, que no passado teve que abandonar o ensino médio para trabalhar, que lutou e luta todos os dias para que eu possa ir além. Obrigada por me proporcionarem o privilégio de estar concluindo o mestrado na UnB, fruto do esforço de vocês.

Aos meus avós, Esther e Walter, Augusta e Antônio, por sempre celebrarem minhas conquistas, por todo amor e carinho dedicados a mim durante a vida inteira.

Ao meu amigo e irmão Raphael.

Aos meus parceiros de trabalho: Paulo, que foi meu primeiro mentor desde a primeira vez que pisei em um laboratório, e que me ensinou tudo, sempre com paciência e amor naquilo que faz, e de quem herdei (ainda mais) perfeccionismo e determinação; Juliana, exemplo de organização e perseverança, por todos os ensinamentos e por ser a pessoa que socorre todo mundo; Danilo, pela praticidade, dedicação e pela habilidade com edição de imagens. Ao Arthur, pela companhia mesmo que breve no laboratório, mas que se encaixou tão bem a todos.

Aos meus orientadores Marlene e Marcelo, por me proporcionarem a oportunidade de realizar este projeto, por acreditarem no trabalho e pela orientação desde o PIBIC. À professora Cynthia e sua aluna Aline, sempre disponíveis para me deixarem usar o termociclador, muito mais vezes do que o previsto.

Às minhas parceiras Beatriz e Caroline, pela amizade e companheirismo de tantos anos, apesar das dificuldades da rotina da vida.

Agradeço, por fim, ao meu companheiro Bruno, que é minha base, que me acompanha e me apoia há tantos anos. Pelo otimismo, por nunca me deixar desistir ou abater com as dificuldades, e principalmente por sempre superá-las comigo. Por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, e por me mostrar que posso ir além. Obrigada por me ensinar o que é parceria de vida, e por ser melhor do que eu poderia um dia imaginar.

Resumo

Algumas espécies que compreendem o *Bacillus cereus sensu lato* são patógenos oportunistas notadamente associados à contaminação de alimentos e surtos de intoxicação alimentar. Apesar disto, ainda é um grupo de bactérias pouco estudado. Recentemente vem sendo descoberto que espécies alocadas fora do grupo do *B. cereus* também podem portar genes de virulência associados à patogênese de doenças antes relacionados apenas a este grupo. A necessidade de caracterização e conhecimento acerca de Bactérias aeróbias formadoras de esporos (Bafes) motivou o isolamento de 312 linhagens do solo do Distrito Federal, que foram denominadas linhagens SDF. No presente trabalho, estas linhagens ambientais foram submetidas ao teste de atividade hemolítica, detecção dos genes de virulência *cytK*, *nhe*, *hbl* e *ces* por PCR, sequenciamento bidirecional dos produtos amplificados e análise e comparação com sequências depositadas no Genbank utilizando a ferramenta BLAST. Para o teste de hemólise, 145 e 165 foram positivas quando incubadas a 28 °C e 37 °C, respectivamente. Dentre as 250 linhagens testadas para genes de virulência, 61 foram positivas, sendo 13 destas identificadas como espécies fora do *B. cereus* *sl* por análise de sequência rRNA 16S e três fora do gênero *Bacillus*. As espécies portadoras de genes codificadores destas toxinas incluem linhagens como *B. weihenstephanensis* e *Geobacillus stearothermophilus* capazes de crescer em condições extremas de temperaturas sendo, portanto, capazes de sobreviver a processos industriais. Estes resultados indicam o potencial patogênico e risco de saúde pública de espécies de Bafes fora do grupo do *B. cereus* e a necessidade de atenção a estes organismos no processo de fabricação e conservação de alimentos, assim como melhorias nos métodos de detecção e atenção dos órgãos regulatórios responsáveis pela segurança alimentar.

Palavras-chave: *Firmicutes*, *Bacillus cereus* *sl*, intoxicação alimentar, virulência;

Abstract

Some species that comprises the *Bacillus cereus sensu lato* are opportunistic pathogens, notably associated with food contamination and food poisoning outbreaks. Despite the risk associated to these species, the group have been so far little studied. Recently, it has been discovered that species allocated outside *B. cereus group* may also bear disease-causing virulence genes previously related only to this group of bacteria. The need for characterization and knowledge about aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) motivated the isolation and preservation of 312 soil strains, assigned as SDF strains. In the present work, these strains were submitted to the hemolytic activity test, detection of *cytK*, *nhe*, *hbl* and *ces* virulence genes by PCR, bidirectional sequencing of the amplified products and analyses and comparison with sequences deposited in Genbank using the BLAST tool. For the hemolysis test, 145 and 165 were positive when incubated at 28 °C and 37 °C, respectively. Among the 250 strains tested for virulence genes, 61 were positive, 13 of which were identified as species outside *B. cereus group* by rRNA 16S sequence analysis, and three outside the genus *Bacillus*. Species carrying genes encoding these toxins include those with extreme growth conditions and capable of surviving industrial processes, such as *B. weihenstephanensis* and *Geobacillus stearothermophilus*. These results indicate the pathogenic potential and public health risk of AEFB species outside the *B. cereus group* and the need for attention to these pathogens in the food manufacturing and preservation processes, as well as improvements in detection methods and attention from regulatory agencies responsible for food safety.

Keywords: *Firmicutes*, *Bacillus cereus sl*, food-poisoning outbreaks, virulence;

Sumário

Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	7
I. Introdução	8
1. Filo <i>Firmicutes</i>	8
2. Virulência em <i>Bacillus spp.</i>	15
3. Transferência horizontal de genes	24
4. Do solo aos alimentos	28
5. Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos.....	29
II. Justificativa.....	29
III. Objetivos	30
Objetivos gerais.....	30
Objetivos específicos.....	30
IV. Metodologia	30
V. Resultados e Discussão	33
1. Avaliação da atividade hemolítica de linhagens SDF	34
2. Genes de virulência em linhagens SDF.....	34
3. Análises das sequências de genes de virulência em linhagens SDF	51
4. Classificação de linhagens SDF baseada em sequências de genes de rRNA 16S.....	58
VI. Considerações Finais.....	58
VII. Informação Suplementar	60
VIII. Referências Bibliográficas	74

Lista de Figuras

Figura 1. Organização do filo <i>Firmicutes</i>.	8
Figura 2. Estágios da endoesporulação em <i>Bacillus</i> spp.	10
Figura 3. Mecanismo de controle transcricional da maioria dos genes de virulência de espécies do grupo do <i>B. cereus</i>. PlcR-PapR.	18
Figura 4. Regulação da expressão de <i>ces</i>.	23
Figura 5. Teste de atividade hemolítica nas 312 linhagens SDF da CBafes.	34
Figura 6. Avaliação do perfil toxigênico de linhagens controle utilizadas neste estudo.	37
Figura 7. Detecção de genes de virulência em linhagens SDF.	39
Figura 8. Amplificação de genes de virulência por PCR convencional.	42
Figura 9. Divergência na amplificação de genes de virulência obtidas por PCR convencional e multiplex.	45
Figura 10. Prevalência de genes de virulência em linhagens SDF utilizadas neste trabalho.	50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados neste trabalho.....	32
Tabela 2. Linhagens controle da avaliação de perfil toxigênico para PCR utilizadas neste trabalho	36
Tabela 3. Divergência da presença de genes de virulência em linhagens SDF com genoma completo sequenciado analisado por BLAST e obtidas por PCR multiplex e convencional	41
Tabela 4. Perfil toxigênico de linhagens SDF obtidos neste estudo	46
Tabela 5. Análise das sequências do gene <i>cytK</i> de linhagens SDF	52
Tabela 6. Análise das sequências do gene <i>nhe</i> das linhagens SDF.....	55
Tabela 7. Análise das sequências do gene <i>hbl</i> das linhagens SDF.....	56
Tabela 8. Análise das sequências do gene <i>ces</i> das linhagens SDF.....	58

I. Introdução

1. Filo *Firmicutes*

O filo *Firmicutes* compreende um dos grupos mais numerosos do domínio Bacteria. Quando foi descrito pela primeira vez por Gibbons e Murray (1978), *Firmicutes* englobava todas as espécies de bactérias Gram positivas. Porém, no atual sistema de classificação, espécies Gram negativas com baixo percentual genômico de G+C estão incluídas neste filo (Ludwig *et al.*, 2011). O filo compreende microrganismos com paredes celulares rígidas ou semi-rígidas contendo elevado número de camadas de peptidoglicano (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004; Gibbons e Murray, 1978). A classe *Negativicutes* abriga os membros Gram negativos, e são espécies que, apesar de diferirem nesta característica, possuem sequências de marcadores moleculares com altos níveis de conservação quando comparadas com os demais representantes do filo.

No presente, a classificação e proposta de inclusão de novos membros de *Firmicutes* baseam-se em sequências de gene de rRNA 16S e características morfológicas, como formação de endósporo (de Vos *et al.*, 2009; Galperin, 2013) (Fig. 1). Atualmente, o filo *Firmicutes* abriga sete classes – *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Limnochordia*, *Negativicutes*, *Thermolithobacteria* e *Tissierellia* — com 46 famílias e 489 gêneros (www.bacterio.net, acessado em 18 de fevereiro de 2019).

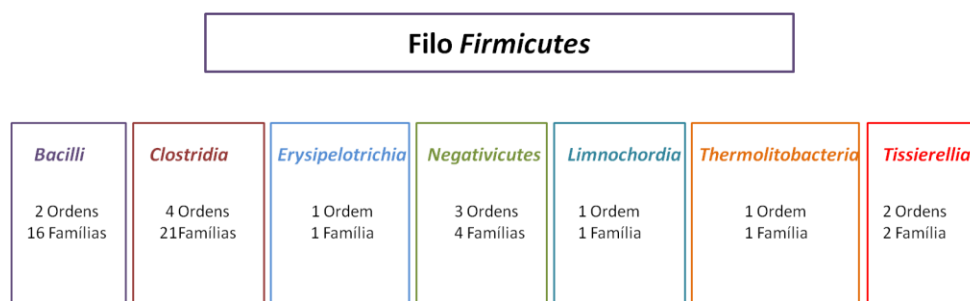


Figura 1. Organização do filo *Firmicutes*. Estrutura das sete classes estabelecidas para o filo *Firmicutes* segundo List of Prokaryotic Names (www.bacterio.net, acessado em 18 de fevereiro de 2019).

Uma propriedade específica do filo, encontrada em espécies aeróbias e anaeróbias, é a capacidade de formação de endósporos, que, entretanto, não é universal (Galperin, 2013). A

classe *Thermolittobacteria* abriga apenas espécies asporogênicas, e nas outras seis classes espécies formadoras de endósporo coexistem com não formadoras.

O processo de endoesporulação inicia-se na transição da fase logarítmica para a fase estacionária, quando a célula vegetativa é submetida a estresses ambientais, principalmente alta densidade populacional e escassez de nutrientes, embora outros fatores também possam estar envolvidos (Driks, 1999).

A endoesporulação tem como organismo modelo o *Bacillus subtilis*, que produz e libera para o meio um esporo por célula. Entretanto, outras espécies esporulantes apresentam características distintas, como a produção de dois a sete endósporos em uma única célula, com fins de reprodução (Hutchison *et al.*, 2014). As características morfológicas, bioquímicas e moleculares do evento descritas a seguir são baseadas em *B. subtilis* e espécies relacionadas.

O esporo maduro, a célula resultante do evento de diferenciação celular, acontece como mecanismo de adaptação e sobrevivência (Giorno *et al.*, 2007) O esporo é uma célula dormente, com metabolismo indetectável, resistente a agentes químicos e físicos e permanece viável por longos períodos de tempo (Setlow, 2003) e a condições do ambiente (de Voos *et al.*, 2009; Galperin *et al.*, 2013), tipicamente letais às células vegetativas (Giorno *et al.*, 2007).

Didaticamente, a endoesporulação pode ser dividida em uma etapa inicial (0) mais sete estágios (I-VII), que são morfológica e bioquimicamente reconhecidos (Fujita e Losick, 2003; Hilbert e Piggot, 2004). Um resumo dos principais eventos está esquematizado na figura 2. No estágio 0 ocorre a duplicação do genoma da célula em diferenciação (esporângio). O genoma duplicado estende-se pelo citoplasma com a formação do filamento axial – estágio I. No estágio II ocorre a formação do septo assimétrico que dá origem a dois compartimentos, da célula-mãe (maior) e do pré-esporo (menor). Neste estágio, o processo de endoesporulação se torna irreversível. O estágio III consiste no engolfamento do pré-esporo pelo envelope da célula-mãe, seguido da montagem das camadas do esporo (estágio IV) e formação das camadas internas e externas da capa e outros componentes externos, como exospório (nem sempre presente) e crosta, no momento descrito apenas para *B. subtilis* (McKenney *et al.*, 2013; estágios V e VI). A última etapa do processo – estágio VII – consiste na degradação (hidrólise) da parede celular do esporângio e liberação do esporo maduro para meio (esporo livre).

O exospório é composto por proteínas, carboidratos e lipídeos organizados em camada na região mais externa do esporo (Redmond *et al.*, 2004). Pode ser encontrado em diversas

espécies tais como aquelas que fazem parte do grupo do *B. cereus*, mas não no modelo de endoesporulação, *B. subtilis* (Driks, 1999; McKenney *et al.*, 2013). Isto indica que não é uma estrutura essencial ao esporo.

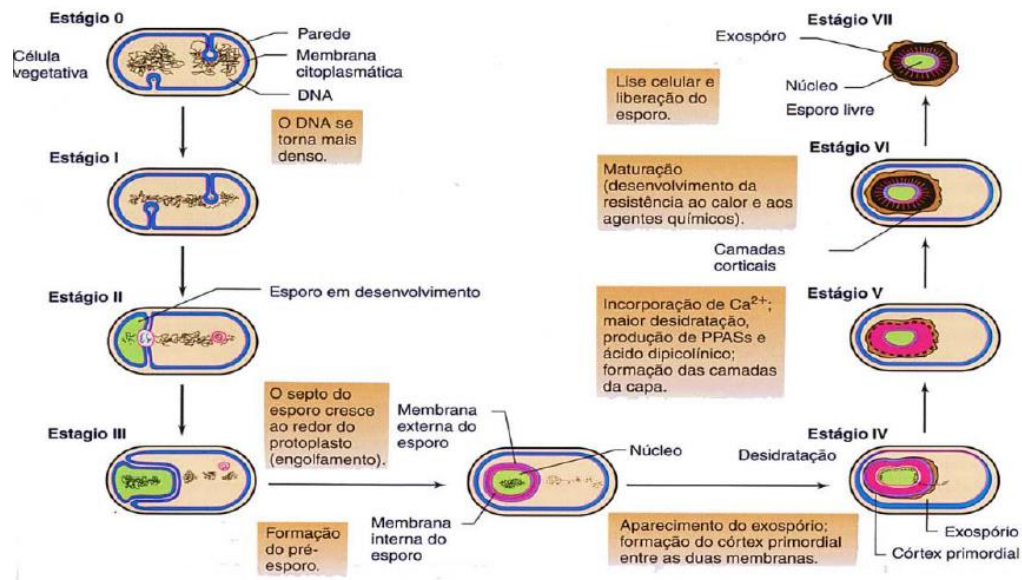


Figura 2. Estágios da endoesporulação em *Bacillus* spp. Fonte: Madigan *et al.*, (2004).

Uma vez livres no ambiente, os esporos monitoram as condições ambientais por meio de receptores (proteínas) e, quando favorável, a germinação se inicia. A detecção de agentes germinantes (moléculas de baixa massa molecular tais como aminoácidos, açúcares, íons e outras) desencadeia uma cascata de reações bioquímicas e hidrolíticas (Christie, 2012). O processo de germinação consiste em alterações nas características celulares do esporo, como hidrólise de estruturas externas, aumento de pH e hidratação do citoplasma (Swerdlow *et al.*, 1981; Setlow, 2003; Christie, 2012), que possibilitam a retomada das atividades proteicas e enzimáticas, até a liberação de nova célula, processo denominado extrusão (Setlow, 2008).

Contudo, como mencionado anteriormente, a formação do endósporo não é comum a todos os representantes de *Firmicutes* (Galperin *et al.*, 2013; Mckenney *et al.*, 2013; Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011; Logan, 2009; De Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Existem linhagens do filo para as quais este processo de diferenciação celular não foi

comprovado, embora tais representantes possuam o arcabouço genético necessário para a ativação do processo. Em adição, outras linhagens são defectivas, e não apresentam genes específicos que codificam atividades envolvidas na formação do endósporo (Galperin *et al.*, 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009).

Em maioria, os membros do filo *Firmicutes* apresentam-se na forma de bastões ou esferas e se reproduzem, principalmente, via fissão binária e são móveis por meio de flagelos (De Vos *et al.*, 2009). Espécies do filo são abundantes em solos e ambientes aquáticos, onde estão envolvidos na decomposição e reciclagem de matéria orgânica (Baik *et al.*, 2008). No entanto, espécies de vários gêneros fazem parte da microbiota normal do intestino de mamíferos e algumas são patogênicos para animais, inclusive humanos, e plantas (Lee *et al.*, 2009; Nguyen e Götz, 2016). Alguns membros do filo *Firmicutes* também são industrialmente valiosos para a produção de antibióticos, enzimas e produtos lácteos (Liu *et al.*, 2012; Kwak *et al.*, 2013).

1.1 Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

Espécies do gênero *Bacillus* e outras espécies formadoras de endósporos alocadas em gêneros relacionados são, coletivamente, denominadas bactérias aeróbias formadoras de endósporos ou Bafes (Galperin, 2013; Fritze, 2004). As Bafes são membros ubíquos de comunidades microbianas em vários ambientes (Hong *et al.*, 2009; Reva *et al.*, 2001), sendo o solo o repositório principal (Maughan e Auwera, 2011; Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013). Os esporos garantem a sobrevivência das espécies durante longos períodos de condições adversas (Singh *et al.*, 2006). As Bafes estão alocadas na ordem *Bacilales*, na classe *Bacilli* que é composta de 16 famílias, sendo sete formadas por gêneros produtores de endósporos – *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae* e *Thermoactinomycetaceae* (www.bacterio.net, acessado em 24 de fevereiro de 2019). Os gêneros de maior destaque em número de espécies conhecidas e de importância industrial e médica são *Bacillus* e *Geobacillus*, alocados na família *Bacillaceae* e *Paenibacillus* e *Brevibacillus* (*Br*), alocados na família *Paenibacillaceae*.

Usualmente, a primeira identificação de Bafes é baseada em características morfológicas de colônia, célula vegetativa, esporângio e esporos livres por microscopia de contraste de fase, coloração de Gram e resposta a testes bioquímicos, associados a metodologias moleculares. Este processo de caracterização baseado num conjunto de características fenotípicas e genotípicas é

denominado polifásico (Colwell, 1970; Logan *et al.*, 2009). As Bafes podem ser isoladas por metodologias simples, que consistem em tratar a amostra por choque térmico ou agentes químicos com consequente seleção de esporos (Fritze, 2004; Logan *et al.*, 2009).

As Bafes são de particular interesse em razão do potencial biotecnológico, como a produção de enzimas e outros bioprodutos de importância industrial, biorremediação, controle biológico, promoção do crescimento de plantas, entre outras aplicações (Couto *et al.*, 2015; Mandic-Mulec *et al.*, 2011).

As Bafes são consideradas importantes componentes de comunidades bacterianas de solo (Mandic-Mulec e Prosser, 2011). A diversidade taxonômica e fisiológica dos isolados do solo é alta e a extrapolação dessa capacidade e diversidade metabólica implica em papéis importantes em funções e processos de ecossistemas de solo. O estilo de vida heterotrófico sugere papel relevante de Bafes no ciclo do carbono, mas, como um grupo, são também importantes no ciclo do nitrogênio do solo, como desnitrificadores, fixadores de nitrogênio e degradadores de nitrogênio orgânico (Cheneby *et al.*, 2000); bem como no ciclo de enxofre como oxidantes de enxofre e na transformação de outros nutrientes de solo, por exemplo, redução de manganês.

Os microrganismos formadores de endósporos são importantes na biorremediação do solo, pela capacidade de degradar compostos designados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e de metilar mercúrio (Chao e Hsu, 2004). Algumas espécies de Bafes produzem grande diversidade de compostos antivirais, antibacterianos e antifúngicos, que podem ser importantes nas interações com outros microrganismos de solo (Logan e Halket, 2011; Fekete, 2009). Estes compostos representam potencial biotecnológico significativo na agricultura e medicina. Muitos desses têm atividade de fosfatase, liberando fosfato para o crescimento das plantas, e possuem uma série de outras propriedades benéficas, que levaram a aplicações comerciais como a disponibilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (Beneduzi *et al.*, 2008).

Dentre os gêneros que abrigam os maiores números de Bafes destaca-se o gênero *Bacillus*, uma grande entidade taxonômica que contém espécies com variadas respostas fisiológicas (Logan e Halket, 2011). Graças à grande resistência dos esporos, espécies do gênero *Bacillus* podem ser isoladas de uma ampla variedade de ambientes aquáticos e terrestres (Pignatelli *et al.*, 2009). Entre estes, podemos destacar *Bacillus* spp. moderadamente halofílicas, que foram isoladas de salinas, águas estuarinas, lagos salgados (lagunas), alimentos salgados, gelo e água marinha (Marquez *et al.*, 2011). O gênero foi descrito pela primeira vez por Cohn em 1872

e, desde então, o número de espécies tem flutuado amplamente entre as diferentes edições do “*Bergey's Manual*” (de Vos *et al.*, 2009).

A diversidade fenotípica dos membros do gênero *Bacillus* é notável, variando desde a capacidade de sobrevivência a altas temperaturas, salinidade extrema, condições ácidas, até resistência ao sistema imunológico de muitos animais (Holt, 1986). Algumas espécies utilizam receptores de elétrons terminais incomuns como arsênio ou selênio (Switzer Blum *et al.*, 1998), têm crescimento aumentado na presença de carvão ativado (Fujita *et al.*, 1996) e são capazes de colonizar ambientes tão peculiares quanto pinturas (Taubel *et al.*, 2003). A amplitude metabólica presente no gênero tem sido aproveitada pela indústria para a produção de moléculas como riboflavina, estreptavidina, beta-lactamase e uma diversidade de toxinas utilizadas contra insetos e nematóides (Zeigler e Perkins, 2009). Atualmente, certas espécies de *Bacillus* são conhecidas por infectarem humanos causando doenças de origem alimentar, notadamente associadas ao *B. cereus*, e o antraz, ao *B. anthracis*. Esses exemplos ilustram a utilidade de algumas espécies de *Bacillus* e o perigo de outras (Maughan e Auwera, 2011).

1.2 Grupo do *Bacillus cereus*

O grupo *B. cereus* ou *B. cereus sensu latu (sl)* — agrega oito espécies distintas: *B. cereus sensu stricto (sl)*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* (Guinebretière *et al.*, 2013) e *B. toyonensis* (Jiménez *et al.*, 2013). Além disso, nos últimos anos a inclusão de outras quatro espécies neste grupo foram propostas: *B. gaemokensis sp. nov.* (Jung *et al.*, 2010), *B. manliponensis sp. nov.* (Jung *et al.*, 2011), *B. bingmayongensis sp. nov.* (Liu *et al.*, 2014), *B. wiedmannii sp. nov.* (Miller *et al.*, 2016).

Os membros do *B. cereus sl* têm impacto significativo na saúde humana, na agricultura e na indústria alimentar (Rasko *et al.*, 2005). Além disso, as bactérias do grupo *B. cereus* produzem várias enzimas valiosas e metabólitos (Nilegaonkar *et al.*, 2007), que degradam diferentes tipos de poluentes e promovem o crescimento de animais e plantas quando usado como probiótico (Guinebretière *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2005). De forma geral, os membros do grupo apresentam células com diâmetro >1 µm, os esporângios não são deformados e, em princípio, são mesofílicos e neutrofílicos (Fritze, 2002). Os esporos de *B. cereus sensu stricto (ss)* são elipsóides, localizam-

se na região central ou pericentral da célula e apresentam exospório (Kotiranta *et al.*, 2000; Jaaskelainen, 2008).

Em virtude da importância médica e econômica, as espécies *B. cereus* ss (*B. cereus*), *B. anthracis* e *B. thuringiensis* são as espécies mais estudadas do grupo (Fiedoruk *et al.*, 2016). O *B. anthracis* é uma espécie de extrema importância na saúde pública pela capacidade de causar uma doença zoonótica, carbúnculo hemático, que pode ser fatal para humanos e outros mamíferos. Porém, vale destacar que o genoma de algumas linhagens de *B. cereus* possuem plasmídeos de virulência similares aos descritos para *B. anthracis* sendo, portanto, capazes de causar doença semelhante ao antraz (Marston *et al.*, 2016). Esta informação genética relacionada com a virulência é trocada entre as linhagens do grupo por meio de transferências dos plasmídeos conjugativos pBCXO1 e pBC210 (Scarff *et al.*, 2016). Algumas linhagens de *B. cereus* ss são consideradas emergentes e capazes de causar bacteremia (Schaefer *et al.*, 2016) ou abscesso cerebral e meningoencefalite (Tusgul *et al.*, 2016), e outras infecções, como oculares, otites e periodontites (Van der Auwera *et al.*, 2007; Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Ramarao e Sanchis, 2013).

No passado, as linhagens pertencentes ao grupo eram classificadas de acordo com as sequências do gene rRNA 16S e características como a presença ou ausência de plasmídeos de virulência (*B. anthracis* e *B. thuringiensis*) (Rasko *et al.*, 2005), morfologia colonial (*B. mycoides* e *B. pseudomycoides*), capacidade psicrófila ou termotolerante (*B. weihenstephanensis* e *B. cytotoxicus*) (Guinebretière *et al.*, 2013; Lechner *et al.*, 1998) e outras características mal definidas. No entanto, o grupo tem sido surpreendentemente resistente a qualquer tipo de classificação satisfatória, e isto se justifica pelo fato de os membros de *B. cereus* sl serem intimamente relacionados e nem sempre ser possível diferenciar as espécies com base em características fenotípicas e bioquímicas detalhadas no Manual de Bergey's (Schleifer *et al.*, 2009), e nem por sequência de genes de rRNA 16S (Liu *et al.*, 2015).

Apesar disto, algumas características fenotípicas têm sido tradicionalmente usadas para diferenciar espécies-chave dentro do grupo (Schleifer *et al.*, 2009). Por exemplo, a produção de cápsulas, ausência de flagelos e incapacidade de causar hemólise são características indicativas de *B. anthracis*. A produção de delta-endotoxinas (proteínas Cry e Cyt) é específica para *B. thuringiensis* e a morfologia da colônia rizóide é específica para *B. mycoides* e *B.*

pseudomycooides. Além destas, a capacidade de crescer a 7 °C, mas não a 43 °C é tipicamente descrita para linhagens de *B. weihenstephanensis*.

A relação filogenética entre as linhagens pertencentes ao grupo do *B. cereus* é tão próxima que, mesmo utilizando métodos moleculares, a classificação dos membros do grupo é bastante desafiadora. Por exemplo, as espécies *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* não podem ser diferenciadas de maneira confiável pela maioria dos métodos de tipagem molecular, incluindo a sequências de genes de rRNA 16S, que apresentam identidade superior a 99%, *rpoB* e *multilocus sequence typing* ou MLST (Cardazzo *et al.*, 2008; Caamaño-Antelo *et al.*, 2015). Consistentemente, estudos empregando sequenciamento genômico completo confirmaram a alta similaridade genética entre as linhagens de *B. cereus* *sl*, o que explica as dificuldades na diferenciação (Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

2. Virulência em *Bacillus* spp.

B. cereus *ss* ou *B. cereus* é um patógeno oportunista que vem sendo associado a infecções alimentares desde o início da década de 1950 (Hauge, 1950). As propriedades patogênicas deste organismo são mediadas pela ação sinérgica de uma grande diversidade de fatores de virulência, que promovem destruição celular e/ou resistência ao sistema imune do hospedeiro (Ehling-Schülz e Messelhäuser, 2013; Ramarao e Sanchis, 2013). Estes compostos podem ser enzimas hidrolíticas, citotoxinas e proteínas de superfície, e são produzidos no início da fase estacionária. As principais toxinas de *B. cereus* *ss*, e melhor caracterizadas, incluem dois complexos protéicos enterotóxicos – hemolisina BL (Hbl) e a toxina não hemolítica (Nhe) –, diversas fosfolipases C, hemolisinas/citolisinas, tais como HlyI ou cereolisina O, HlyII, HlyIII e HlyIV ou citotoxina K (CytK), e cereulídeo (Ces), peptídeo ácido e termo-estável (Chaves *et al.*, 2011; Ehling-Schulz *et al.*, 2005).

A maioria destas toxinas possui ação contra eritrócitos e, então, pode ser classificada como hemolisinas, que resultam em diferentes padrões de halos hemolíticos quando cultivadas em placas de ágar sangue (Ramarao e Sanchis, 2013). Além disto, a capacidade hemolítica de *B. cereus* *ss* pode se dar pela ação conjunta de fosfolipase C, fosfatidilcolina específica (PC-PLC) e enfiingomielinase (SPH), que formam um complexo denominado Cereolisina AB — CerAB (Gilmore *et al.*, 1989). O complexo CerAB hidrolisa a enfiingomielinina da membrana

citoplasmática de eritrócitos (Doll *et al.*, 2013), e, portanto, causa hidrólise por ação enzimática, diferindo de outras toxinas hemolíticas citadas anteriormente, que são formadoras de poros.

Os membros do grupo do *B. cereus* possuem alta similaridade genética, e, portanto, estas espécies vêm sendo associadas à contaminação de alimentos e capacidade de causar intoxicação alimentar, além de unicamente *B. cereus* ss. Desde a associação a intoxicações alimentares, o número de estudos acerca das toxinas produzidas pelo grupo *B. cereus* é crescente e, as preocupações das indústrias alimentícias também. Em razão da alta capacidade de dispersão e adesão dos esporos, as espécies membro do grupo estão presentes em vários ambientes dedicados a produção de alimentos (Arnesen *et al.*, 2008). Além de ser altamente relatada em produtos lácteos, a presença de citotoxinas de *B. cereus* sl já foram descritas em arroz, molhos, vegetais e carnes (Kramer e Gilbert, 1989; Park *et al.*, 2018; Osman *et al.*, 2018). Portanto, quando a segurança alimentar está em pauta, as toxinas produzidas por membros do grupo do *B. cereus* estão sempre em evidência, desde a produção até a conservação do produto final.

Além das doenças gastrointestinais, espécies de *B. cereus* sl já foram descritas por serem causadoras de outras infecções, como oculares, otites e periodontites, dentre outras (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Ramarao e Sanchis, 2013; Van der Auwera *et al.*, 2007). Corroborando estes dados, um estudo de Liaqat *et al.* (2018) demonstrou que a maioria (26%) dos contaminantes de lentes de contato são espécies enterotoxigênicas do grupo *B. cereus*.

Adicionalmente, ao longo dos anos, os genes que codificam os fatores de virulência típicos de *B. cereus* ss vem sendo observado em outras espécies fora do grupo e não podem mais ser associadas diretamente a determinada espécie, e sim a determinada linhagem (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013). A presença da toxina emética cereulideo, por exemplo, era antes relacionada unicamente a *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2005a), mas já foi descrita em outras espécies como *B. weihenstephanensis* (Thorsen *et al.*, 2006).

2.1 Síndrome diarreica

A espécie *Bacillus cereus* foi associada pela primeira vez à intoxicação alimentar quando foram descritos os primeiros surtos de síndrome diarreica em hospitais da Noruega entre 1947 e 1949 (Arnesen *et al.*, 2008). A síndrome diarreica está associada às toxinas Hbl, Nhe e CytK, produzidas durante a fase log, por células ingeridas em associação com alimentos contaminados. A toxinas são produzidas por células vegetativas, ou esporos que germinam e tornam-se

metabolicamente ativos no intestino do hospedeiro (Andersson *et al.*, 1998a; Clavel *et al.*, 2004). Este dado revela a alta capacidade de sobrevivência das células quando submetidas ao baixo pH estomacal (Clavel *et al.*, 2004).

Após a ingestão do alimento contaminado, os sintomas podem levar de 8 a 16 h para aparecer, sendo dor abdominal, diarreia aquosa e náusea, que duram, em média, de 12 a 24 h, apesar da ocorrência de mortes relatadas em casos mais graves (Agata *et al.* 1994 e 1995; Shinagawa *et al.*, 1995). A carga microbiana infecciosa varia de 10^5 a 10^8 unidades formadoras de colônia e os alimentos mais associados a este tipo de infecção são as carnes, sopas, vegetais, molhos, leite e derivados (Granum *et al.*, 2007).

2.2 Síndrome emética

A síndrome emética foi relatada pela primeira vez no Reino Unido, no início da década de 1970, após vários surtos de intoxicação alimentar causados pela ingestão de arroz cozido (Mortimer e McCann, 1974). Esta síndrome é causada pela toxina cereulídeo, que é sintetizada ainda no alimento antes da ingestão. Por ser uma toxina termoresistente e estável em pH ácido, a estrutura da toxina permanece ativa após o cozimento e/ou reaquecimento de alimentos e ao trato digestivo do hospedeiro, respectivamente (Arnesen *et al.*, 2008).

O tempo de incubação da síndrome emética varia entre 30 min e 6 h, o que indica que a produção da toxina ocorre já no próprio alimento (Arnesen *et al.*, 2008), e os sintomas típicos, náusea e vômito, podem durar de 6 a 24 h. A produção do cereulídeo ocorre ao final da fase logarítmica durante o crescimento vegetativo, e tem pico de síntese no início da fase estacionária. Apesar de a temperatura ótima para a síntese desta toxina estar entre 12 e 37 °C (Finlay *et al.*, 2000; Haggblom *et al.*, 2002), linhagens psicrotolerantes de *B. weihenstephanensis* foram capazes de produzir cereulídeo a 8 °C (Thorsen *et al.*, 2006). Apesar de usualmente ser uma doença branda e de rápida duração, há alguns casos letais da doença emética, provavelmente em decorrência de falência da função hepática. Quando avaliado em modelos animais, a carga infecciosa varia entre 10^5 - 10^8 células por grama de alimento, ou 8-10 µg de toxina por kg de peso corpóreo (Agata *et al.*, 1994, 1995; Shinagawa *et al.*, 1995).

Os alimentos mais comumente associados à síndrome emética são aqueles ricos em amido, arroz frito e cozido e massas (Granum, 2007).

2.3 Fatores de virulência e regulação da transcrição

A expressão das enterotoxinas Nhe, Hbl, HlyI e CytK (HlyIV) é controlada pelo ativador transcricional PlcR e é mediada por um sistema de *quorum sensing* (Fig. 3) (Doll *et al.*, 2013). A ação pleiotrópica de PlcR requer PapR, um peptídeo sinal que também é expresso sob controle de PlcR, e exportado para o meio externo e processado (Gominet *et al.*, 2001; Bouillaut *et al.*, 2008). O heptapeptídeo ativo resultante é importado pela célula pelo sistema da OppABCDF oligopeptide permease. Uma vez que a densidade bacteriana aumenta, há também a elevação da concentração de PapR intracelular, que promove a interação PlcR-PapR. O complexo PlcR-PapR se liga ao sitio de reconhecimento, uma sequência de DNA palindrômica denominada PlcR *box*. A ligação ocasiona uma retroalimentação positiva, que regula de forma ascendente ou crescente (do inglês *upregulation*) a expressão de um regulón composto por 45 genes. As proteínas correspondentes são então secretadas para o meio externo ou ligadas a parede celular bacteriana e atuam na interface entre o organismo e ambiente, causando a degradação de tecidos ou inibição do sistema imune do hospedeiro (Gohar *et al.*, 2008). Por fim, quando a bactéria entra em fase estacionária, a transcrição de *plcR* e dos genes regulados pelo respectivo produto, PlcR, é reprimida pelo fator transcricional Spo0A fosforilado.

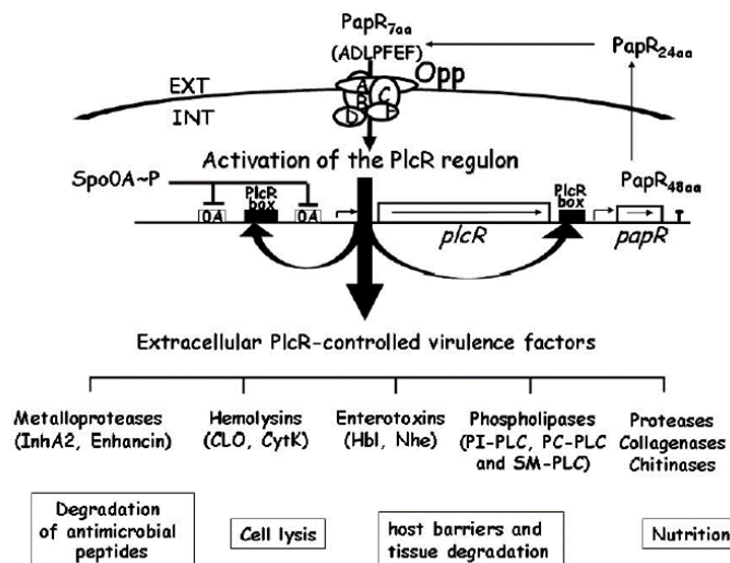


Figura 3. Mecanismo de controle transcricional da maioria dos genes de virulência de espécies do grupo do *B. cereus*. PlcR-PapR. Fonte: Ramarao e Sanchis, 2013.

O complexo de transcrição PlcR-PapR é conhecido como principal regulador transcricional de genes de virulência de espécies do grupo *B. cereus* no início da fase estacionária (Slamti e Lereclus, 2002). Evidenciando esta afirmação, mutantes sem atividade de PlcR não expressam *cytK-1*, demonstrando que a regulação da expressão é dependente de PlcR (Ramarao e Sanchis, 2013).

Em contraste com os genes enterotoxigênicos de localização cromossomal citados anteriormente, a informação genética de proteínas envolvidas na síntese de Ces está localizada em um megaplasmídeo (Ehling- Schulz *et al.*, 2006). O plasmídeo denominado pCER270, de 270 kb, compartilha alta similaridade de sequência com o plasmídeo pXO1 de *B. anthracis*. Plasmídeos da família de pXO1 apresentam altos níveis de conservação da informação relacionada com a origem de replicação e manutenção do plasmídeo e de sequências de genes que expressam atividades envolvidas na esporulação e germinação (Ravel *et al.*, 2007).

Os genes estruturais da peptídeo sintetase não-ribossomal — NRPS (do inglês *non-ribosomal peptide synthetase*) — *cesA* e *cesB* codificam os módulos responsáveis pela incorporação dos monômeros para a formação da cadeia peptídica da toxina Ces, CesA e CesB, respectivamente, um heterodímero. Um módulo NRPS é composto por domínios básicos, responsáveis pelo reconhecimento de substrato e catálise da cadeia em crescimento, e domínios auxiliares, que contribuem para a diversidade estrutural das proteínas, como epimerização e metilação (Walsh *et al.*, 2001; Sieber e Marahiel, 2005). NRPS são grandes complexos multienzimáticos moduladores que produzem uma série de compostos naturais como antibióticos, surfactantes e toxinas (Ehling-Schulz *et al.*, 2015).

Os mecanismos da doença emética ainda não são completamente elucidados. Apesar disto, estudos realizados com camundongos demonstraram que, no duodeno, o cereulídeo se liga a receptores 5-HT₃, levando ao aumento do estímulo do nervo vago aferente, o que causa náusea e vômito (Agata *et al.*, 1995). Esta toxina age como ionóforo de cátions e é capaz de inibir atividade da mitocôndria, a partir da inibição da oxidação de ácidos graxos, semelhante a ação da valinomicina (Mikkola *et al.*, 1999). Em outro estudo realizado em camundongos, no qual o cereulídeo sintético foi injetado nestes animais, notou-se grande degeneração de hepatócitos (Yokoyama *et al.*, 1999). Além destes, outros efeitos do cereulídeo foram demonstrados, como danos celulares (Shinagawa *et al.*, 1996) e inibição das células *natural killer* humanas (Paananen *et al.*, 2002).

2.3.1 Hemolisina BL

A hemolisina BL (Hbl) foi primeiramente purificada de *B. cereus* F837/76 isolado de uma ferida pós-operatória (Turnbull *et al.*, 1979). Trata-se de um complexo de toxina formado por três proteínas: L₂, L₁ e B (Beecher e MacMillan, 1991), expressas respectivamente a partir dos genes *hblC*, *hblD* e *hblA*.

Uma das principais toxinas causadoras da síndrome diarreica, a hemolisina BL já foi comprovadamente associada ao acúmulo de fluídos em intestino de camundongos (Beecher *et al.*, 1995b), atividades dermonecroticas, permeabilidade vascular (Beecher e Wong, 1994b), atividade citotóxica em células Vero e de retina (Lund e Granum, 1997), além de atividade hemolítica para eritrócitos de diversas espécies (Beecher e MacMillan, 1990).

Os genes que fazem parte do complexo da hemolisina BL são constante e amplamente encontrados nas investigações de linhagens potencialmente toxigênicas. Owusu-Kwarteng *et al.* (2017) detectaram a presença de pelo menos um dos genes da família do *hbl* em 72 de 96 isolados de produtos laticínios. Gao *et al.* (2018) detectaram a presença de genes do complexo HBL em 45% dos isolados de leite pasteurizado na China. No Brasil, 51,8% dos isolados de leite UHT e pasteurizados do Rio de Janeiro analisados continham genes do complexo HBL (Chavez *et al.*, 2017). Em relação a outros alimentos, 45,2% dos isolados de carne continham o gene *hblA* (Osman *et al.*, 2018).

2.3.2 Enterotoxina não-hemolítica

Assim como Hbl, a enterotoxina não-hemolítica (Nhe) é uma toxina tripartida, composta pelas proteínas NheA, NheB e NheC, codificadas pelo operon *nheABC*. Esta citotoxina foi primeiramente isolada de um grande surto de intoxicação alimentar na Noruega, em 1995, causado por *B. cereus* NVH0075/95, uma linhagem que não contém genes *hbl* (Granum *et al.*, 1995; Lund e Granum, 1996). As proteínas dos complexos Nhe e Hbl são funcional e estruturalmente similares e compartilham grau significativo de identidade de aminoácidos, variando de 18 a 44% entre as sequências gênicas. Quando analisadas as relações entre os dois complexos, as proteínas NheB e NheC são mais relacionadas a HblD (Arnesen *et al.*, 2008).

Apesar de o nome dado a esta toxina sugerir o contrário, Fagerlund *et al.* (2008) demonstraram que o complexo Nhe apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de mamíferos. Arnesen *et al.* (2008) sugerem que o status de incapacidade hemolítica, que deu o nome à Nhe,

deve ter sido originado após a comparação de padrões hemolíticos, mais evidentes quando produzidos por Hbl.

Também responsáveis por causar síndrome diarreica, as proteínas do complexo Nhe promovem a formação de poros na bicamada lipídica (Fagerlund *et al.*, 2008). Ao longo dos anos, Nhe vem sendo associada a surtos de intoxicações alimentares causados por *Bacillus spp.* isolados de diversas fontes. O estudo de Heini *et al.* (2018) demonstrou que 100% dos isolados originários de alimentos infantis, em nível de processamento e produto final, e frutas processadas são portadores do gene *nhe*. Ainda neste trabalho, 12 de 20 isolados de purê de batata em pó, também, são positivos para esse gene. Em adição, 93% dos isolados de leite pasteurizado na China (Gao *et al.*, 2018), 100% dos isolados de leite UHT e pasteurizado no Rio de Janeiro (Chavez *et al.*, 2017) e 12,9% dos isolados de carne (Osman *et al.*, 2018) apresentam um ou mais genes que codificam as toxinas do complexo Nhe.

2.3.3 Citotoxina K

A citotoxina K (CytK), ou hemolisina IV, pertence à classe das proteínas necróticas, hemolíticas e formadoras de poros (Hardy *et al.*, 2001) e foi parcialmente caracterizada por Beecher *et al.* (2000). Lund, *et al.* (2000) sequenciaram o gene *cytK* que codifica CytK, obtido da linhagem, então nomeada, *B. cereus* NVH 391/98. Esta linhagem foi isolada de um surto de intoxicação alimentar caracterizado por diarreia e/ou diarreia hemorrágica em idosos, com a morte de três pacientes. A linhagem *B. cereus* NVH 391/98 não produz nenhuma das outras toxinas até então descritas para o grupo *B. cereus*. Novas investigações culminaram com a proposição de uma nova espécie membro do grupo *B. cereus*, denominada *B. cytotoxicus* NVH391/98, que é considerada linhagem tipo codificadora do gene *cytK* (Guinebretiere, *et al.*, 2013).

Alguns anos após a caracterização de CytK, Fagerlund *et al.* (2004) isolaram uma variante desta proteína a partir de *B. cereus* NVH 1230/88, que foi denominada de CytK-2. A sequência de aminoácidos de CytK-2 apresenta 89% de similaridade com a primeira toxina identificada (CytK-1). CytK-2 é a variante mais comumente encontrada em *B. cereus* e apresenta 1/5 da toxicidade de CytK-1, quando analisada em cultura de células Caco-2 e Vero (Guinebretiere *et al.*, 2006). Ainda pouco se sabe sobre o modo de ação de CytK. Os estudos de Hardy *et al.*, (2001) sugerem que o mecanismo de CytK-1 consiste em formar poros nas células epiteliais,

resultando no extravasamento de fluidos e necrose celular. Alguns anos mais tarde, Guinebretiere *et al.*, (2006) demonstraram que o mecanismo de ação de CytK-2 se assemelha ao de CytK-1, apesar da diferença de toxicidade citada anteriormente.

Atualmente se sabe que a heterogeneidade genotípica de *B. cereus* sugere que o potencial patogênico da espécie é determinado pela ação sinérgica de vários fatores de virulência (Ceuppens *et al.*, 2011; Kamar *et al.*, 2013; Ramarao e Sanchis, 2013; Yang *et al.*, 2016). Em adição, a combinação de adaptações e níveis de expressão dos genes de toxinas e as variações, como CytK-1 e CytK-2, contribuem para a enterotoxicidade da espécie.

Desde a descoberta da CytK, diversos estudos apontaram para uma ampla distribuição dos genes *cytK-1* e *cytK-2* entre as espécies do grupo do *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Chaves *et al.* 2017; Owusu-Kwarteng *et al.*, 2017) e, mais recentemente, em espécies menos relacionadas ao grupo, tais como *B. licheniformes*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Geobacillus staerothermophilus*, pertencentes a família *Bacillaceae* e *Brevibacillus brevis*, família *Paenibacillaceae*, isoladas de fontes direta ou indiretamente ligadas a contaminação em alimentos (Osman *et al.*, 2018).

Em 2017, Chaves *et al.* demonstraram que 55,5% de *B. cereus* *sl* isolados de diversas marcas brasileiras de leite pasteurizado continham o gene *cytK-2*. Ainda analisando leite pasteurizado, um grupo da China demonstrou que 73% de *B. cereus* isolados continham genes *cytK* (Gao *et al.*; 2018). Em adição, estudos realizados por Osman *et al.* (2018) e Park *et al.* (2018) demonstraram que 58,9% dos isolados de carne branca e vermelha no Egito e 70% dos isolados de vegetais crus na Coreia continham genes *cytK*, respectivamente. Estes e outros estudos sugerem a ampla distribuição e prevalência de toxinas CytK entre bactérias isoladas das mais variadas fontes, que podem ser responsáveis pelos surtos de intoxicação alimentar por membros do grupo *B. cereus* e outras Bafes relacionadas.

2.3.4 Cereulídeo

O cereulídeo é a toxina causadora da síndrome emética. É um pequeno dodecadepsipeptídeo cíclico de 1,2 kDa, resistente ao calor e pH ácido. Esta característica confere resistência ao sistema digestivo do hospedeiro, continuando ativo mesmo depois de ser submetido ao pH estomacal ou às enzimas proteolíticas do trato intestinal. Apesar de estar comumente relacionado a doenças brandas e de rápida duração, o cereulídeo foi relacionado a

dois casos letais de intoxicação alimentar em uma menina de sete anos e um adolescente de 17 anos cujas mortes foram relacionadas à falência do fígado (Mahler *et al.*, 1997; Dierick *et al.*, 2005).

A transcrição do *cluster* de genes relacionados ao complexo NRPS-Ces se inicia durante o final da fase logarítmica e é desativada após a transição para fase estacionária (Dommel *et al.*, 2011). A regulação temporal da transcrição do *cluster de genes ces* depende de fatores regulatórios codificados por elementos genéticos cromossomais, o que evidencia o *crosstalk* entre plasmídeo-cromossomo e a correlação entre virulência e metabolismo (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). Estes reguladores da transcrição de genes *ces* podem ser tanto intrínsecos, tais como nutrição, energia, respiração, quanto extrínsecos — fatores ambientais, tipo de alimento onde a bactéria está situada — além dos estágios de desenvolvimento celular (Figura 4).

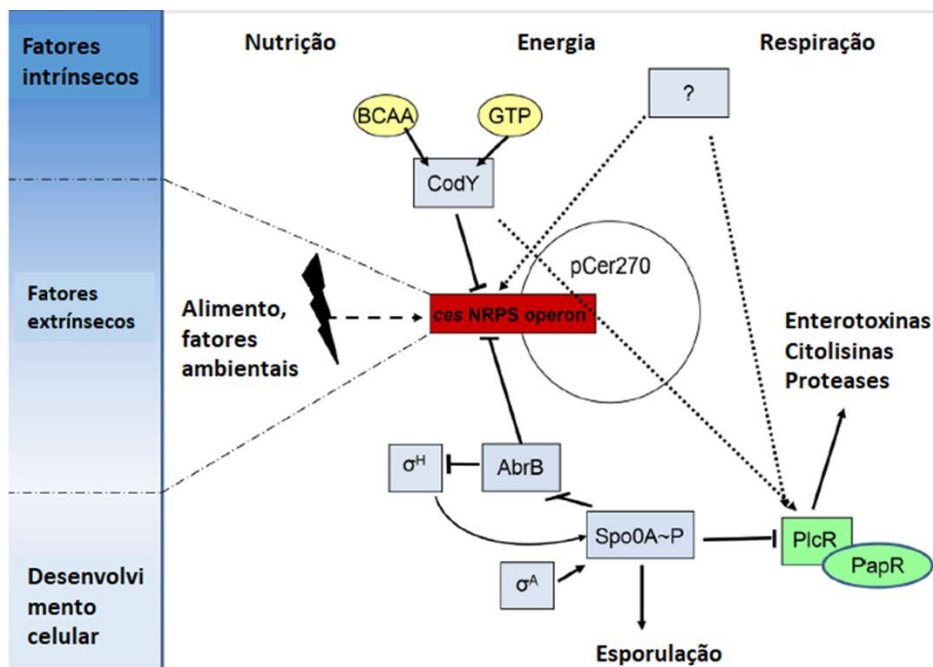


Figura 4. Regulação da expressão de *ces*. Adaptado de Ehling-Schulz *et al.*, 2015.

Dentre os fatores intrínsecos à célula, em relação à nutrição celular, pode-se citar CodY como regulador importante da transcrição de *ces*. CodY é um regulador pleiotrópico que media as adaptações da fase estacionária em várias bactérias Gram positivas com baixo conteúdo G+C (Sonenshein, 2005). A afinidade de CodY à ligação ao DNA é mediada pelas moléculas ligantes

BCAA e GTP, que, quando presentes, ativam CodY e reprimem expressão de *ces* (Ehling-Schulz *et al.*, 2015). A produção de cereulídeo é, portanto, diretamente relacionada à disponibilidade nutricional e a expressão de *ces* ocorre quando os repressores de CodY não estão presentes, mas a indisponibilidade de nutrientes ainda não é tão severa a ponto de iniciar a esporulação (Ehling-Schulz *et al.*, 2015).

Em relação aos fatores extrínsecos à célula, é importante citar temperatura, presença de oxigênio — apesar de os limites ideais para a transcrição de *ces* ainda não serem bem definidos. Messelhäusser *et al.*, (2014) revelaram que a interação complexa entre ácidos graxos, fontes de carbono e nitrogênio, micro e macronutrientes, pH e disponibilidade de água podem atuar no estímulo ou repressão da síntese de *ces*. O tipo de alimento no qual a bactéria se encontra também pode ser determinante para a produção de cereulídeo. Frenzel *et al.*, (2011) demonstraram que um balanço delicado nos níveis de aminoácidos é necessário para a formação de cereulídeo, que devem ser suficientemente baixos para liberar os repressores do promotor de *ces* e ao mesmo tempo altas para servirem como precursores da cadeia peptídica. Este resultado vai de encontro com o fato de alimentos proteicos serem menos propícios à formação de cereulídeo (Ehling-Schulz *et al.*, 2015).

O número de estudos que visam abordar a segurança alimentar é crescente. Gao *et al.* (2018) demonstraram a presença de linhagens isoladas de leite pasteurizado portadoras dos genes *ces*, onde 5% das linhagens contêm o gene *cesB*. Heini *et al.* (2018) demonstraram que a presença de linhagens eméticas em 1 de 8 formulados em pó de alimentos infantis analisados. Adicionalmente, Cui *et al.* (2016) demonstraram que 1,1% de linhagens isoladas do ambiente em uma fazenda e de produtos lácteos possuíam genes *ces*.

3. Transferência horizontal de genes

Transferência horizontal de genes (THG) é o compartilhamento de material genético entre organismos que não tem relação parental (Soucy *et al.*, 2015) e é um mecanismo amplamente reconhecido na adaptação de procariotos, principalmente quando relacionado à resistência a antibióticos e patogenicidade (Tatum *et al.*, 1947; Forsberg *et al.*, 2012). A transformação foi o primeiro dos três eventos de THG descritos em procariotos e foi primeiramente observada por Griffith no final da década de 1920 em *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928). Adicionalmente, em procariotos a THG pode ocorrer pelos eventos conjugação ou transdução.

Em organismos naturalmente transformáveis o evento transformação ocorre no final da fase logarítmica, quando as células se tornam competentes. A competência é um estado fisiológico em que são capazes de internalizar fragmentos de DNA exógeno, livres no meio (Berka *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2002). A translocação do DNA para o citoplasma ocorre mediada por proteínas de membrana formadoras de canais, e que são altamente conservadas (Chen and Dubnau, 2004; Claverys *et al.*, 2009). Durante a transformação em bactérias Gram positivas, uma das fitas DNA é translocada ao citoplasma enquanto a outra é degradada na superfície da célula receptora. Em Gram negativas, a hidrólise ocorre no citoplasma, após internalização do fragmento de DNA de fita dupla. Então, o DNA exógeno é inserido no DNA da célula por recombinação homóloga e transferidos para as futuras gerações após a replicação do material genético (Dwivedi *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2013, 2014).

Zhang *et al* (2018) demonstraram a ocorrência de transformação natural célula a célula entre diferentes isolados de *B. subtilis* e entre *B. subtilis* e outras espécies de *Bacillus*, sugerindo que a transformação natural célula a célula dependente do doador pode ser uma característica ubíqua entre as espécies de *Bacillus*. Adicionalmente, estes autores demonstraram que a frequência deste tipo de transformação natural aumenta significativamente em condições de estresse, como depleção de nutrientes e presença de antibióticos.

A transferência de genes por conjugação foi descrita em *Escherichia coli* (Tatum e Lederberg, 1947), havendo casos descritos entre bactéria e levedura, e, também, *Agrobacterium spp.* que utilizam da maquinaria de conjugação para transferir material genético às plantas (Kyndt *et al.*, 2015). Este mecanismo, mediado por informações genéticas localizadas em plasmídeos conjugativos, consiste na transferência de genes via contato célula-célula através de *pilus* conjugativo expresso por doadoras (portadoras de plasmídeos conjugativos) em Gram negativas, enquanto em Gram positivas as células receptoras são reconhecidas por moléculas associadas à superfície celular de uma célula doadora.

A conjugação é modulada por elementos genéticos localizados na região *tra* (transferência) de plasmídeos conjugativos, que também apresentam outros elementos genéticos tais como transposons e sequências de inserção (Johnson e Grossman, 2015). O mecanismo de transferência de DNA por conjugação é mediado por um complexo de proteínas associadas à membrana que pertencem ao sistema de secreção tipo IV. A conjugação está diretamente

envolvida no transporte de fatores de virulência em bactérias patogênicas, informações contidas em plasmídeos conjugativos ou co-transportadas durante o evento. (Cabezón *et al.*, 2015).

Em *B. thuringiensis*, a conjugação foi evidenciada pela primeira vez em 1982 (González e Carlton) em um estudo clássico que confirmou a localização plasmidial de genes *cry*. No mesmo ano, González e Carlton demonstraram conjugação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*.

A transdução, terceiro evento de THG descrito para procariotos em 1952 em *Salmonella* (Zinder e Lederberg, 1952) consiste na entrega de material genético celular por bacteriófagos, que incorporaram parte do material de uma célula hospedeira durante a montagem das partículas (Soucy *et al.*, 2015). O vírion resultante é designado partícula transdutora e, por não carregar o genoma viral completo, são incapazes de promover um novo ciclo de infecção viral, sendo por esta razão, também denominadas defectivas.

Existem dois tipos de transdução: a generalizada, na qual uma parte aleatória do material genético da célula hospedeira é incorporada durante a montagem das partículas virais; e a especializada, quando o profago se excisa do genoma hospedeiro e incorpora apenas os genes adjacentes ao sítio de integração. Por meio dos dois tipos de transdução, bacteriófagos podem transferir fragmentos de DNA cromossomal e plasmidial, que incluem transposons ou ilhas genômicas que conferem vantagem ao hospedeiro garantindo, assim, sua sobrevivência e disseminação (Modi *et al.*, 2013; von Wintersdorff *et al.*, 2016). A transferência de genes de resistência a antimicrobianos, como eritromicina, tetraciclina, gentamicina são exemplos de genes disseminados por transdução (Hyder e Streitfeld, 1978; Fard *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2012).

3.1 Evidências da transferência horizontal de genes

Os métodos de detecção de THG consistem, principalmente, em análises de sequências genômicas, visto que essas transferências nem sempre resultam em alterações fenotípicas. Estes métodos podem ser classificados em dois grupos: métodos paramétricos e métodos filogenéticos (Ravenhall *et al.*, 2015).

Os métodos paramétricos consistem na busca de regiões do genoma que diferem do geral, como conteúdo G+C e diferenças de códons preferenciais. Este método analisa as mudanças que tenham ocorrido apenas no organismo que está sendo estudado, e conferia vantagem no começo da era de sequenciamento (Guindon e Perrière, 2001). Entretanto, atualmente pode levar a super predições por não considerar variações intragenômicas. Adicionalmente, as mutações no genoma

também podem ser observadas com genes adquiridos, dificultando a detecção destes (Lawrence e Ochman, 1997), o que limita os métodos paramétricos.

Os métodos filogenéticos avaliam a história evolutiva do gene, e pode ser dividido em abordagens que utilizam a construção de árvores filogenéticas ou outras medidas, como distâncias evolucionárias emparelhadas (Dessimoz *et al.*, 2008). Este método inclui avaliações de perfis filogenéticos, discrepância entre distância de genes e espécies, combinação de sequências entre organismos de diferentes espécies, entre outros. O atual cenário da alta quantidade de sequências disponíveis beneficia este método, que permite comparar múltiplos genomas e analisar a abordagem evolutiva do processo (Ravenhall *et al.*, 2015). Apesar disto, este método se baseia em árvores previamente construídas e na confiabilidade destes estudos anteriores, o que limita esta técnica. A fim de minimizar falsos positivos de evidências de THG, é recomendada a combinação de métodos paramétricos e filogenéticos (Poptsova, 2009).

3.2 Virulência em espécies formadoras de endósporos alocadas fora do grupo *B. cereus*

Levando em consideração os eventos de THG descritos anteriormente, juntamente com a elevada relação molecular entre os membros do gênero *Bacillus*, surgiu a necessidade de avaliar a presença de genes de virulência, codificadores de toxinas causadoras de doenças transmitidas por alimentos, em espécies fora do grupo do *B. cereus* (Phelps e MCKillip, 2002). Com isto, ao longo dos anos, o número de estudos que abordam de maneira mais ampla a detecção dos genes causadores das síndromes diarreica e emética vem aumentando significativamente.

Logo, diversas espécies de Bafes contendo genes antes descritos apenas em genomas de membros do *B. cereus* *sl* foram isoladas de alimentos *in natura* ou processados e de matéria-prima e solo. Dentre estas, estão *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. fusiformis* (From *et al.*, 2005); *B. licheniformis* (Salkinoja-salonen *et al.*, 1999); *B. circulans*, *B. megaterium*, *L. sphaericus* (Rowan *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2018); *B. amyloliquefaciens*, *B. lentimorbis*, *Sporosarcina pasteurii* (Phelps e McKillip, 2002); *B. simplex* (De Bellis *et al.*, 2015); *B. flexus*, *P. amylolyticus* (Celandroni *et al.*, 2016); *P. alvei* e *G. stearothermophilus* (Osman *et al.*, 2018).

A escassez de dados acerca de intoxicações alimentares causadas por espécies que não pertencem ao *B. cereus* *sl* se deve à falta de dados clínicos destas infecções, por serem, em maioria, doenças simples e de curta duração. Alinhado a este fator, também há a limitação na identificação destas bactérias e diferenciação entre espécies de um mesmo grupo ou subgrupo.

Apesar disto, o número de estudos que detectam genes de virulência em outras espécies fora do grupo do *B. cereus* é crescente e estes resultados indicam que estas espécies também oferecem risco à saúde pública e demandam investigação adicional (Osman *et al.*, 2018).

4. Do solo aos alimentos

A ubiquidade das Bafes permite que estes organismos estejam presentes nas várias etapas do processo de produção de alimentos até o produto final (Soni *et al.*, 2016). Há evidências de presença de esporos em tetas de vaca (Andersson *et al.*, 1995), em feno e outros alimentos destes animais (Kramer e Gilbert, 1989), que podem ser a origem de contaminações em produtos lácteos. Wood e Waites (1988) também descreveram a presença de *B. cereus* em ovos, resultante da falta de higiene e desinfecção adequadas neste tipo de indústria.

A alta capacidade de resistência dos esporos aos agentes químicos e físicos é o principal problema das indústrias em geral. A resistência a altas temperaturas, variação de pH e sanitizantes utilizados na limpeza — os quais geralmente são eficazes para células vegetativas — fazem com que estes organismos persistam nas linhas de produção e possibilitem o crescimento em alta densidade de *Bacillus spp.* (Arnesen *et al.*, 2008) e outras espécies formadoras de endosporos. Adicionalmente, a formação de biofilme de *B. cereus* contribui para a persistência da contaminação industrial e a ineficiência de sanitizantes (Ryu e Beuchat, 2005).

Outra condição que facilita a preservação destes organismos viáveis em alimentos são os métodos de conservação utilizando temperaturas baixas. Espécies como *B. weihenstephanensis*, que são psicrotolerantes, são frequentemente isolados de alimentos submetidos ao resfriamento por longos períodos de tempo com o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos mesófilos (Wong *et al.*, 1988; Te Giffel *et al.*, 1997; Larsen e Jørgensen, 1999).

Além dos ambientes onde as Bafes são comumente encontradas e a associação destas com a contaminação de alimentos, o estudo de Østensvik *et al.* (2004), que investigou a presença de esporos de *Bacillus spp.* em vários rios da Noruega, detectou a presença de isolados citotóxicos na superfície destas águas. Isto sugere que o fornecimento de água também deve ser um meio considerado como porta de entrada de contaminação por *Bacillus spp.* e outras espécies formadoras de endosporos no processo de fabricação de alimentos.

5. Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

A importância de estudos básicos sobre a diversidade e potencialidades biotecnológicas de Bafes motivou o isolamento, identificação, classificação e preservação de linhagens de solo do DF, designadas linhagens SDF. A estratégia polifásica de caracterização para fins taxonômicos tem revelado diferentes propriedades fenotípicas, genotípicas e relações filogenéticas destas linhagens ambientais. As linhagens SDF estão depositadas na Coleção de Bafes (CBafes), da UnB/IB/Departamento de Biologia Celular. Localizada no Laboratório de Microbiologia/LaBafes, a Coleção é especializada em linhagens de interesse científico e com potencial tecnológico para os setores médicos (humano e veterinário), agropecuário, ambiental e industrial. Atualmente, a CBafes (www.cbafes.biomol.unb.br) inclui um acervo 312 linhagens selvagens (SDF0001-SDF0312).

A solicitação de Acesso a Amostra Componente do Patrimônio Genético foi autorizada pelo CNPq (010439/2015-3).

II. Justificativa

A alta capacidade de dispersão e adesão de esporos de *B. cereus* *sl* faz com que estes organismos estejam presentes nos mais diversos ambientes de produção de alimentos (Ryu e Beuchat, 2005). Considerados patógenos oportunistas, as toxinas produzidas por estes organismos são responsáveis por diversas doenças e consideradas umas das maiores causas de intoxicação alimentar, embora a maioria de curta ou média duração.

Apesar de estes surtos terem sido associados apenas a membros do grupo do *B. cereus* por muitas décadas, o desenvolvimento de novas metodologias possibilitou a descoberta de outras espécies virulentas de Bafes alocadas fora do grupo, dentro da ordem *Bacillales*. Além disto, a alta diversidade genética deste grupo, juntamente com trocas genéticas, sugere potencial patogênico das Bafes.

O número de estudos que visam caracterizar linhagens ambientais de Bafes e que busquem genes de virulência associados à intoxicação alimentar ainda é baixo. Por esta razão, a varredura das linhagens SDF depositadas na CBafes com o objetivo de identificar a presença destes fatores de virulência contribuirá para a compreensão sobre a ecologia e as trocas genéticas entre as diversas populações, além de contribuir para o conhecimento do potencial toxigênico destas

linhagens, inclusive em espécies fora do grupo do *Bacillus cereus*, e fornecer conhecimento acerca do risco para segurança alimentar representado por estas espécies.

III. Objetivos

Objetivos gerais

Avaliar o perfil toxigênico de amostras ambientais de Bafes depositadas na CBafes/UnB, ou linhagens SDF.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade hemolítica;
- Avaliar a presença dos genes de virulência das famílias *cytK*, *nhe*, *hbl* e *ces*;
- Realizar sequenciamento bidirecional dos produtos obtidos por PCR;
- Gerar sequências consensos parciais a partir das fitas senso e anti-senso de DNA;
- Classificar linhagens SDF por sequências de genes de rRNA 16S.

IV. Metodologia

Coleta e isolamento. As linhagens utilizadas neste trabalho foram coletadas do solo do Distrito Federal, isoladas e estocadas conforme descrito em Cavalcante *et al.*, 2018, exceto que o choque térmico de seleção foi de 80 °C para as amostras SDF0001-0154, e 60 °C, 70 °C ou 80 °C para as amostras SDF155-312. Em resumo, 1 g de solo foi adicionado a 10 mL de solução salina 0,9% e misturado com vórtice por 2 min. Um mL da suspensão foi incubada na temperatura de seleção, deixada no gelo por 5 min e 0,1 mL foi semeado em ágar nutriente (Acumedia™). Depois de 1-21 dias de incubação a 28 °C, as Bafes foram selecionadas por microscopia de contraste de fase e re-isoladas nas mesmas condições para obtenção de cultura pura. Após crescimento, células de uma colônia isolada foram inoculadas em caldo nutriente (Acumedia™) e incubadas a 28 °C com agitação de 200 rpm. Após pelo menos 90% da população estar completamente esporulada (esporos livres no meio), 1 mL da cultura foi submetido a choque térmico em temperatura similar a de seleção, por 10 min, seguido de incubação no gelo por 5 min. Cerca de 250 µL da suspensão de esporos foram transferidos para 5 tubos de preservação de 2 mL, contendo tiras de papel filtro

e mantidas em estufa a 37 °C para secagem. Os tubos foram selados com Parafilm™ e estocados a temperatura ambiente.

Teste de atividade hemolítica. Com o auxílio de um palito, células de uma colônia isolada em meio Luria-Bertani sólido (LB: Extrato de levedura 0,5% (p/v); peptona de caseína 1% (p/v); NaCl 1% (p/v); ágar 1,8%; pH: 7,2) foram transferidas para a superfície do meio ágar sangue (bioMérieux) contido em placa de Petri com grade numerada. O inóculo foi realizado em duplicata. A primeira placa foi incubada a 28 °C e a segunda a 37 °C, por 24 a 48 h. A presença de halo de hemólise circundante a uma colônia, em qualquer uma das condições, foi considerada como atividade hemolítica positiva. *L. sphaericus* CCGB745 e *B. thuringiensis* CCGB1163 obtidas do *Bacillus Genetic Stock Center* (BGSC; Ohio State University USA) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

Extração de DNA total. Para o crescimento das linhagens de interesse, 20 µL da suspensão de trabalho contendo esporos foram cultivadas em placas de Petri com meio LB com a ajuda de alças descartáveis. Após 24-48 h de crescimento a 28 °C, células provenientes de uma colônia isolada foram inoculadas em meio LB líquido e a cultura foi incubada por 12-24 h/200 rpm. O DNA total foi obtido utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Amplificação de genes de virulência. A amplificação de fragmentos dos genes de interesse por PCR seguiu o protocolo descrito por Ehling-Schulz *et al.* (2006): 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 3 mM; primers (Tabela 1): 200 nM CesF1 e CesR2; 1 µM de HD2F e HA4R, 300 nM de NA2F e NB1R e 400 nM de CKF2 e CKR5; 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase (ThermoFisher), tampão 1X e 1 µL de DNA total. O primeiro conjunto de amplificação foi realizado utilizando o kit PCR Master Mix (Promega), nas mesmas condições. As sequências dos quatro pares de primers utilizados neste estudo estão descritas na tabela 1. As reações foram realizadas no modo convencional (único par de *primer* por reação) ou multiplex (quatro pares de *primers* no mesmo sistema de amplificação), com volume final de 25 µL e 50 µL, respectivamente. Os genes de virulência foram amplificados em termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95 °C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C; 30 s a 49 °C, e 1 min a 72 °C, finalizando com 2 min de amplificação a 72 °C.

Sequências de genes *cytK*, *nhe* e *hbl* localizados em diversas linhagens de *Bacillus cereus* *sl* foram utilizadas para gerar sequências consensos destes genes. Neste estudo, os autores

consideraram que os polimorfismos existentes poderiam causar falsos negativos resultantes de ampliações iniciadas por oligonucleotídeos disponíveis até então para a detecção de genes codificadores das toxinas Hbl e Nhe (Mantynen e Lindstrom, 1998; Hansen e Hendriksen, 2001; Guinebretiere *et al.*, 2002). Nas sequências dos *primers* propostos, as bases nitrogenadas correspondentes a estas mutações pontuais foram substituídas por inosina (Tabela 1).

Além disto, os *primers* direto (senso) e reverso (anti-senso) são complementares a dois genes diferentes do operóns que codificam as famílias Nhe (gene *nheA* e *nheB*) e Hbl (genes *hblD* e *hblA*), respectivamente. Os primers complementares às sequências de genes *cytK* foram direcionados a regiões altamente conservadas dos dois genes conhecidos, possibilitando a detecção de ambas as formas – *cytK-1* e *cytK-2*. Para detectar a presença de genes envolvidos na síntese de cereulídeo (Ces), os *primers* foram desenhados para anelar na sequência do gene que codifica as proteínas cereulídeo sintetases (genes *ces*), cujos produtos estão envolvidos na produção da toxina (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b).

Tabela 1. Primers utilizados neste trabalho

Primer	Gene alvo	Tamanho esperado do fragmento (pb)	Sequência (5' - 3')	Referência	
CKF2	<i>cytK</i>	421	ACAGATATCGGICAAAATGC	Ehling-Schulz <i>et al.</i> , 2006.	
CKR5			CAAGTIACTTGACCIGTTGC		
NA2F	<i>nhe</i>	766	AAGCIGCTCTTCGIATTC		
NB1R			ITIGTTGAAATAAGCTGTGG		
HD2F	<i>hbl</i>	1091	GTAAATTAIGATGAICAATTC		
HA4R			AGAATAGGCATTCATAGATT		
CesF1	<i>ces</i>	1271	GGTGACACATTATCATATAAGGTG		Ehling-Schulz <i>et al.</i> , 2005a.
CesR2			GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		

Análise dos produtos de PCR. Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), observados em transiluminador com luz ultravioleta e documentados com o auxílio de câmera digital.

Sequenciamento e análise dos genes de virulência. Os produtos de PCR foram quantificados em um nanofotômetro (IMPLEN P330), purificados utilizando o *PCR purification kit* (Qiagen),

de acordo com as instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento bidirecional pelo método de Sanger, utilizando os serviços da Universidade Católica de Brasília.

Sequências consenso. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada com a ferramenta PHRED considerando o valor de corte ≥ 20 . As sequências senso e anti-senso foram transformadas em sequências consenso utilizando a ferramenta Contig Assembly Program – CAP - do programa BioEdit (versão 7.0.5.3), com os parâmetros: sobreposição mínima de bases: 20; e mínimo de correspondência de 85%.

Análise por BLAST. As 21 SDF que possuem genoma completo sequenciado foram submetidas ao alinhamento local a fim de detectar a presença dos genes de virulência comumente descritos para o grupo do *B. cereus*. A lista de genes utilizados e os códigos de acesso estão na tabela S3 na seção Informação Suplementar.

Classificação baseada em sequências de gene de rRNA 16S. Um microlitro de DNA total foi adicionado ao sistema de PCR contendo 0,4 pmol de cada primer (27F: 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'; 1492R: 5' GGY TAC CTT GTT AGG ACT T 3'; Lane *et al.*, 1991; O'Sullivan *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 2004); 1,5 U de Taq polimerase (Sigma); 0,15 mM de dNTP; 3 mM de MgCl₂; tampão 1x, em um volume final de 25 μ L. O DNA alvo foi amplificado em termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando as seguintes condições: 94 °C por 30 s; 52 °C por 30 s, 72 °C por 1,5 min, num total de 25 ciclos seguidos de um período adicional de extensão a 72 °C de 10 min. Os produtos obtidos foram analisados, purificados e sequenciados como descritos para os genes de virulência. As sequências consenso geradas foram utilizadas para classificação taxonômica por BLAST (Altschul, *et al.*, 1990). O limiar de identidade de sequências de genes rRNA 16S para predição de espécie e gênero corresponde a $\geq 97\%$ e 95–96%, respectivamente (Schloss e Handelsman, 2004).

V. Resultados e Discussão

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil toxigênico das linhagens SDF por meio da atividade hemolítica em ágar sangue, pesquisa de genes de virulência codificadores de quatro toxinas (*cytK*, *nhe*, *hbl* e *ces*), e complementação da classificação das linhagens da CBafes utilizando sequência de genes de rRNA 16S.

1. Avaliação da atividade hemolítica de linhagens SDF

O teste de atividade hemolítica em placas de ágar sangue realizado em duplicata para as 312 SDF foi positivo após 24 h de incubação para 72 (23,07%) ou 118 (37,8%) quando incubadas a 28 °C e 37 °C, respectivamente. Após 48 h de incubação, 145 (46,47%) ou 165 (52,8%) foram positivas a 28 °C e 37 °C, respectivamente (Figura 5).

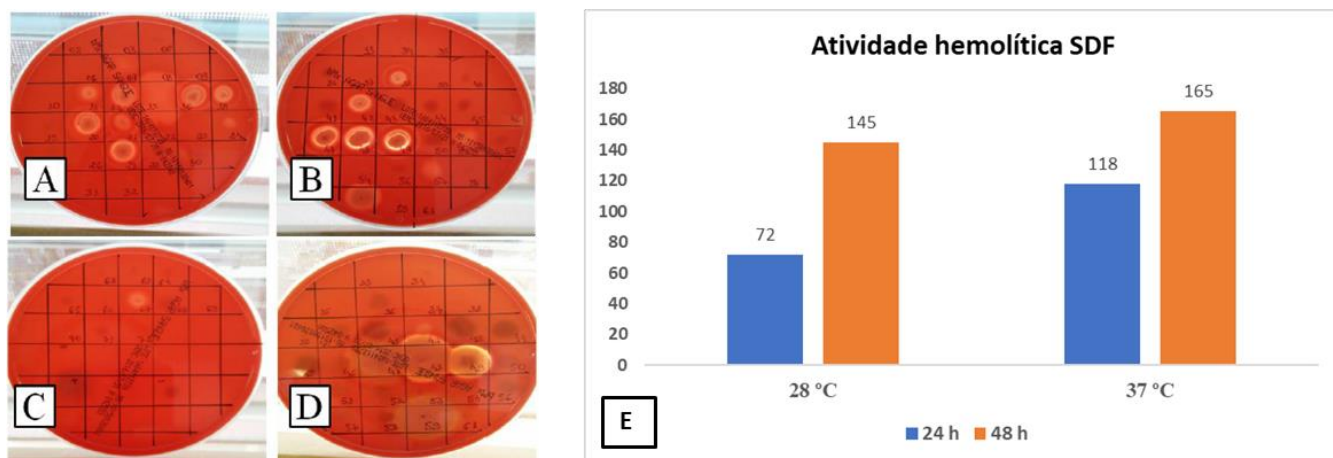


Figura 5. Teste de atividade hemolítica nas 312 linhagens SDF da CBafes. A), B), C) Placas de ágar sangue incubadas a 37 °C; D) Placa de ágar sangue incubada a 28 °C; E) Número de linhagens SDF positivas quando incubadas a 28 °C e 37 °C, após leituras em 24 h e 48 h de incubação.

2. Genes de virulência em linhagens SDF

Em razão do elevado número de linhagens SDF depositadas na CBafes, e visando analisar a presença de genes de virulência no máximo de amostras possíveis, foi realizada uma busca por metodologias rápidas, de baixo custo e eficazes para a avaliação do perfil de toxigênico dessas linhagens. Assim, para o rastreamento dos respectivos genes codificadores, os trabalhos de Monika Ehling-Schulz *et al.* (2005b e 2006) foram utilizados como referência. Esses autores desenharam oligonucleotídeos iniciadores universais (*primers* universais) para a amplificação de sequências parciais de genes codificadores das quatro famílias de toxinas, frequentemente descritos em linhagens do grupo *B. cereus* e outras espécies de Bafes relacionadas.

2.1 Avaliação da presença de genes de toxinas por PCR multiplex

A fim de obter controles para a PCR, linhagens tipo gentilmente cedidas pelo *Bacillus Genetic Stock Center* – BGSC/EUA e Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos— CCGB/IOC— Rio de Janeiro/RJ foram submetidas às mesmas condições de cultivo, extração de DNA e amplificação por PCR multiplex utilizando PCR Master Mix (Promega). As linhagens utilizadas para este fim e os fragmentos amplificados estão descritas na tabela 2 e figura 6, respectivamente.

Dentre as linhagens de Bafes utilizadas como controle, sete (6A45; 6A24; 9A2; 6A5, 6A13; CCGB-IOC 1163 e CCGB-IOC 0780) foram positivas para pelo menos dois genes de virulência (Tabela 2). Corroborando o que foi descrito por Ehling-Schulz e Messelhäuser (2013), Kolsto *et al.* (2009) e Phelps e McKillip (2002) acerca da diversidade genética de Bafes e do potencial patogênico destes organismos — uma das razões que motivaram a execução deste projeto — ainda nesta etapa inicial foram detectadas a presença de genes de virulência das famílias *cytK* e *nhe* em uma espécie que não pertence ao grupo do *B. cereus*, *Geobacillus stearothermophilus* 9A2.

É importante ressaltar que, ao contrário do grupo do *B. cereus* que é composto por espécies mesófilas, os membros do gênero *Geobacillus* são espécies termófilas de Bafes (Burgess *et al.*, 2010), com crescimento ótimo entre 55 e 65 °C (Nazina *et al.*, 2001). Pelo caráter termófilo de crescimento de *Geobacillus spp.*, em geral, estas espécies são isoladas de diversos ambientes com temperaturas elevadas, como fontes termais, campos de petróleo, sedimentos marítimos profundos, refinarias de açúcar, alimentos enlatados, vegetais desidratados e laticínios (Burgess *et al.*, 2017; Kakagianni e Koutsoumanis, 2018). Além disto, espécies desse gênero têm despertado grande interesse industrial devido ao potencial biotecnológico para fins de biorremediação, produção de enzimas termoestáveis e biocombustíveis (Feng *et al.*, 2007; Bhalla *et al.*, 2013, Boonmark *et al.*, 2013; Wiegand *et al.*, 2013).

Apesar do potencial biotecnológico, as espécies do gênero *Geobacillus* são contaminantes comuns de alimentos em natura e processados (Tai *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2007; Postollec *et al.*, 2012 Lucking *et al.*, 2013). A espécie *G. stearothermophilus* foi primeiramente isolada de milho enlatado e é contaminante comum de produtos lácteos, em especial o leite em pó. Também já foi encontrado em vegetais e sopas desidratados (Burgess *et al.*, 2017) e, mais recentemente, em carnes (Osman *et al.*, 2018). As propriedades hidrofóbicas dos endósporos e a capacidade de

resistência ao calor, dessecação e sanitizantes permitem, respectivamente, a adesão a equipamentos de produção e sobrevivência a processos de limpeza (Andersson *et al.*, 1995; Ryu e Beuchat, 2005). Adicionalmente, o processo de pasteurização geralmente é ineficiente para estes organismos, mesmo em células em estado vegetativo (Lucking *et al.*, 2013).

Tabela 2. Linhagens controle da avaliação de perfil toxigênico para PCR utilizadas neste trabalho

Linhagem	Origem	Perfil toxigênico
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 1A1	BGSC	N/O
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 13A10 / ATCC 12123	BGSC	N/O
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> 19A1 / ATCC 7055T	BGSC	N/O
<i>Paenibacillus macerans</i> 22A1	BGSC	N/O
<i>Rummeliibacillus pycnus</i> 24A1	BGSC	N/O
<i>Brevibacillus brevis</i> 26A1 / ATCC 8246	BGSC	N/O
<i>Brevibacillus formosus</i> 26A2	BGSC	N/O
<i>Paenibacillus alvei</i> 33A1	BGSC	N/O
<i>Brevibacillus laterosporus</i> 40A1 / ATCC 9141	BGSC	N/O
<i>Brevibacillus centrosporus</i> 42A1	BGSC	N/O
<i>Bacillus mycoides</i> 6A13	BGSC	<i>cytK, nhe</i>
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 6A24	BGSC	<i>cytK, nhe</i>
<i>Bacillus cereus</i> 6A45	BGSC	<i>ces, nhe</i>
<i>Bacillus cereus</i> 6A5 / ATCC 14579	BGSC	<i>cytK, nhe</i>
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> 80A1	BGSC	N/O
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 9A2	BGSC	<i>cytK, nhe</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> CCGB-IOC 0407	IOC-RJ	N/O
<i>Bacillus circulans</i> CCGB-IOC 0411	IOC-RJ	N/O
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>marrisoni</i> CCGB-IOC 0780	IOC-RJ	<i>nhe, hbl</i>
<i>Brevibacillus laterosporus</i> CCGB-IOC 1107	IOC-RJ	N/O
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i> CCGB-IOC 1163	IOC-RJ	<i>cytK, nhe</i>
<i>Bacillus subtillis</i> CCGB-IOC 1249	IOC-RJ	N/O

BGSC: *Bacillus Genetic Stock Center*; CCGB-IOC RJ: Instituto Oswaldo Cruz. N/O: não observado.

A detecção de genes de virulência causadores de intoxicação alimentar em uma linhagem de *G. stearothermophilus* evidencia os riscos associados a bactérias que permanecem viáveis na faixa de temperatura empregada nos processos de produção e controle de qualidade de alimentos. Controlar estes organismos ainda é uma tarefa árdua devido à dificuldade de rastrear a origem da contaminação e falta de informação sobre toxicidade (Lucking *et al.*, 2013). De fato, até o

presente momento, há na literatura apenas um estudo recente que mostra a presença de genes responsáveis por intoxicação alimentar em dois isolados do gênero *Geobacillus* (Osman *et al.*, 2018).



Figura 6. Avaliação do perfil toxigênico de linhagens controle utilizadas neste estudo. A análise de produtos de PCR obtidos para famílias de genes de virulência localizados em linhagens controle foram realizadas em gel de agarose 1%. **(A)** Linhagens tipo testadas (Tabela 2); **(B)** Gel referência de linhagens tipo positivas para um ou mais genes de virulência; O marcador de massa molecular 1 kb ladder (Promega) foi resolvido em paralelo na primeira coluna de ambos os géis. O tamanho do fragmento (em pb) está indicado a direita da banda correspondente.

Dando prosseguimento, o DNA total de 250 linhagens SDF foi utilizado como molde para testar a presença de genes de toxinas utilizando os quatro pares de *primers* em um único sistema de amplificação (PCR multiplex). Nesta etapa do trabalho, 54 (21,6%) linhagens testadas foram positivas para a presença de um ou mais genes de virulência (Figura 7; Tabela S1 da seção informação suplementar).

O gene de virulência encontrado em maior número nesta etapa do trabalho (Tabela S1) foi o *cytK*, em 44 (17,6%) linhagens, seguido do gene *nhe* em 29 (11,6%) das linhagens SDF analisadas por PCR multiplex. O gene *hbl* foi encontrado em 11 (4,4%) linhagens SDF. O gene

ces estava presente em 3 (1,2%). Esta etapa das análises também revelou que pelo menos um dos quatro genes de virulência foram observados em 5 linhagens SDF de espécies não pertencentes ao grupo do *B. cereus*: a SDF0103 classificada como *B. safensis*; as SDF0115, SDF0201 e SDF0207 classificadas como *B. pumilus* e a SDF0227 classificada como *P. ginsengagri*.



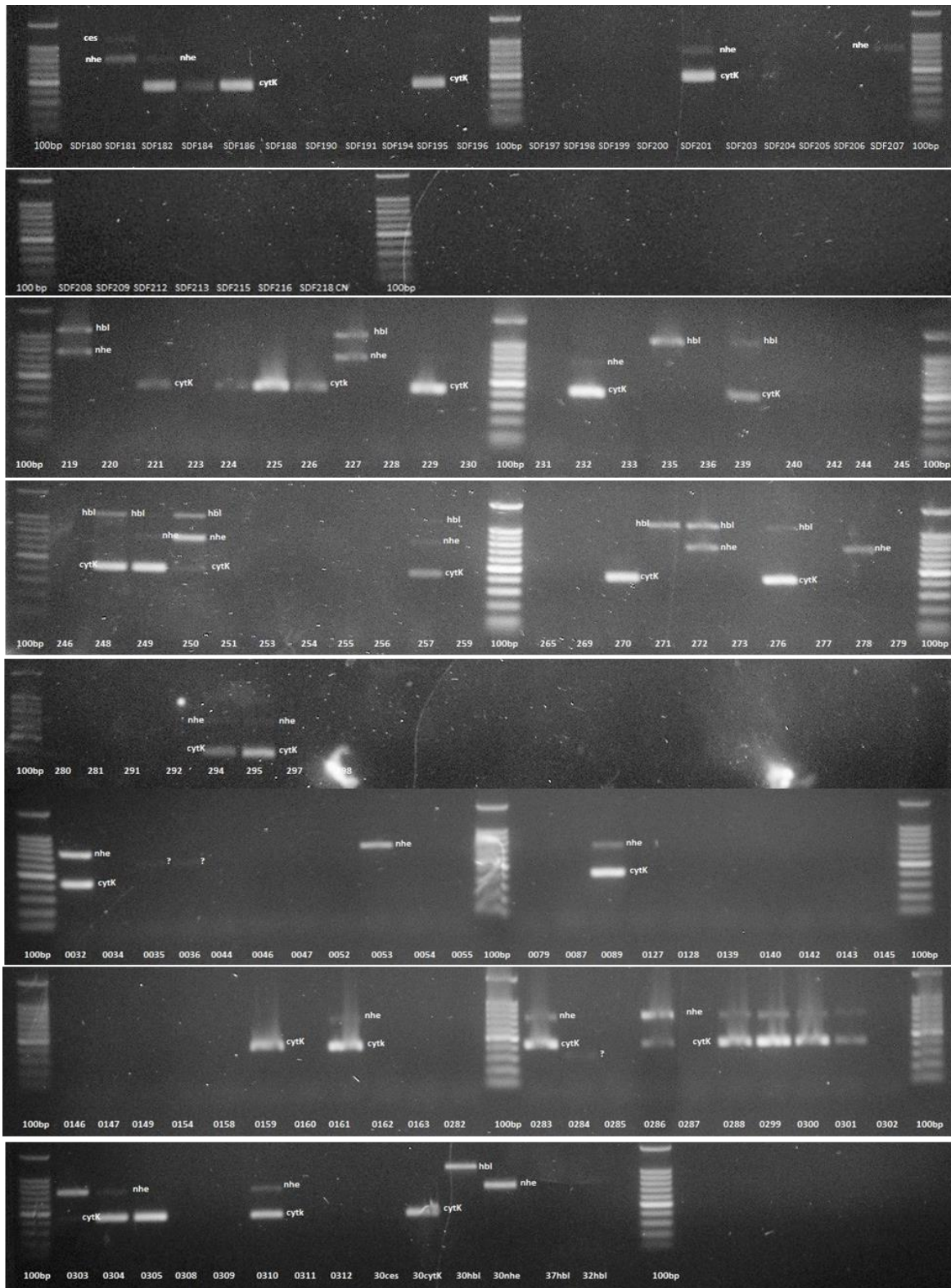


Figura 7. Detecção de genes de virulência em linhagens SDF. Os genes de virulência *hbl*, *nhe*, *cytK* e *ces* amplificados por PCR obtidos em reação simultânea (PCR multiplex) utilizando DNA total de 250 linhagens SDF foram resolvidos em gel de agarose 1%. Os nomes dos genes correspondentes estão indicados ao lado das respectivas bandas. Os números que designam as linhagens SDF estão indicados na parte inferior de cada coluna. O marcador de massa molecular 100 bp ladder (Promega) foi resolvido em paralelo na primeira coluna, no meio e fim dos géis.

2.2 Alinhamento local de sequências de genes de virulência com sequências de genomas completos

Como mencionado anteriormente, as linhagens SDF estão sendo caracterizadas para fins taxonômicos utilizando estratégia polifásica. A metodologia inclui classificação e filogenia baseada em sequências de genes de rRNA 16S, em conjunto com sequências completas de genomas obtidas de linhagens selecionadas. A fim de avaliar a presença de genes de virulência nestes genomas com sequências disponíveis foram realizadas análises utilizando a ferramenta BLAST e sequências dos quatro genes de virulência amplificados por PCR, em conjunto com sequências de genes adicionais que codificam outros fatores de virulência encontradas no banco de dados do Genbank (NCBI). As sequências utilizadas nesta análise estão dispostas na tabela S3 da seção informação suplementar.

A partir dos resultados da análise de 20 genomas de linhagens SDF *in silico* (Tabela S3) foi possível observar que nem todos os genes encontrados por esta abordagem foram amplificados pelo sistema de PCR multiplex, quando o DNA total da linhagem correspondente foi utilizado como molde. As divergências de resultados comparando as duas metodologias estão descritas a seguir e resumidas na tabela 3: para a linhagem SDF0030, na análise por BLAST foram detectados a presença dos genes *cytK*, *nhe* e *hbl*, ao passo que a amplificação por PCR revelaram apenas a presença de *cytK*; para as linhagens SDF0037 e SDF0062 foi observado a presença do gene *hbl* utilizando BLAST e nenhum dos quatro genes de virulência por PCR.

Para confirmar a ineficiência em obter a informação do conjunto de genes utilizando PCR multiplex, foi realizado um teste de PCR convencional utilizando os quatro pares de *primers* em quatro amplificações independentes com as linhagens SDF0030, SDF0037, SDF0056, SDF0100, SDF0101 e SDF0147. Os produtos amplificados estão mostrados na figura 8. Quando comparados aos resultados previamente obtidos (Fig. 7), esta condição foi confirmada.

Ao contrário do sistema multiplex, que amplificou apenas o gene *cytK* da linhagem SDF0030, nas reações convencionais foram amplificados fragmentos das sequências dos genes *cytK*, *nhe* e *hbl*. Da mesma forma, as linhagens SDF0037, SDF0056 e SDF0147 foram negativas para todos os genes na PCR multiplex, e positivas para *cytK* e *nhe* na PCR convencional. Por fim, as linhagens SDF0100 e SDF0101 foram positivas apenas para *cytK* quando amplificados por PCR multiplex enquanto que foi observada a presença de *cytK*, *nhe* e *hbl*, por PCR convencional.

Tabela 3. Divergência da presença de genes de virulência em linhagens SDF com genoma completo sequenciado analisado por BLAST e obtidas por PCR multiplex e convencional

SDF	Espécie	BLAST	PCR	
			Multiplex	Convencional
0005	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>CLO</i>	NO	NO
0020	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>CLO, nrps</i>	NO	NO
0030	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>hbl, spH, HlyIII, plcr, nhe, cytK, CLO</i>	<i>cytK</i>	<i>cytK, nhe, hbl</i>
0037	<i>Lysinibacillus. sphaericus</i>	<i>hbl, CLO</i>	NO	<i>cytK, nhe</i>
0062	ND	<i>Hbl, CLO</i>	NO	<i>nhe, hbl</i>
0063	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	<i>CLO</i>	NO	NO

NO: Não observado. ND: Não determinada.

Em razão do baixo custo e tempo de execução, a realização de amplificação por PCR multiplex é crescente em estudos biológicos e médicos, inclusive para fins de identificação de espécies e segurança alimentar (Sint *et al.*, 2012). As condições de amplificação por sistema multiplex aplicadas neste trabalho foram idênticas àquelas descritas em um estudo previamente bem estabelecido (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Apesar disto, como relatado anteriormente, a estratégia se mostrou ineficaz para o levantamento do perfil toxigenico das linhagens SDF.

Markoulatos *et al.* (2002) demonstraram que, numa reação multiplex, os fragmentos que são alvos de *primers* com sequências complementares mais precisas serão preferencialmente amplificados. Nossas análises empregando os quatro conjuntos de *primers* (PCR multiplex) corroboram esta demonstração. Dentre as 54 linhagens SDF analisadas pelo sistema multiplex, 44 foram positivas para a presença do gene *cytK*, enquanto 29 continham o gene *nhe*, sendo estes dois os mais abundantes nas amostras analisadas.

Adicionalmente, é sabido que a eficiência de amplificação a partir de *primers* universais, complementares a genes ortólogos, pode variar entre espécies (Polz e Cavanaugh, 1998; Sipos *et al.*, 2007). As linhagens utilizadas no estudo de Ehling-Schulz *et al.*, (2006) são, em maioria, membros do grupo do *B. cereus* e espécies previamente conhecidas. A CBafes é uma coleção que tem como principal característica uma grande diversidade de espécies (Cavalcante, 2018; Martins, 2018; Orem, 2018; Tabela S1), onde muitas linhagens ainda estão em processo de identificação. Apesar do uso crescente desta metodologia ao longo dos anos, estudos que discutam problemas metodológicos ou que proponham melhorias e padronizações para PCR multiplex ainda são escassos (Sint *et al.*, 2012).

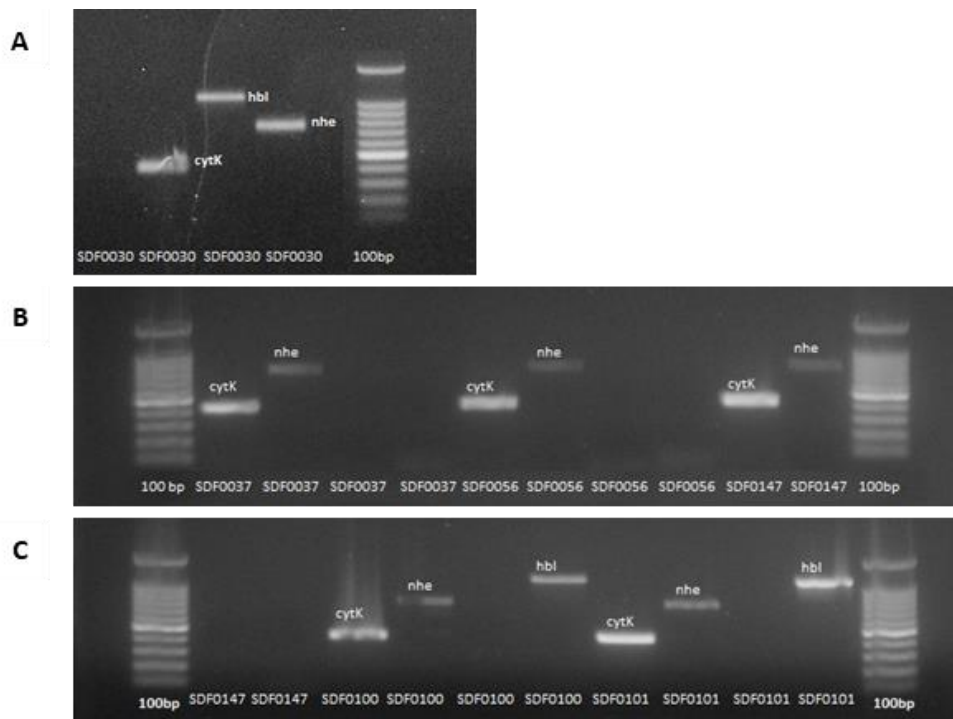


Figura 8. Amplificação de genes de virulência por PCR convencional. Os produtos de PCR obtidos por reações individuais dos quatro pares de primers foram resolvidos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. (A) SDF0030; (B) SDF0037, SDF0056, SDF0147; (C) SDF0147, SDF0100, SDF0101; O nome dos genes correspondentes está indicado acima ou ao lado das respectivas bandas. Os números que designam as linhagens SDF estão indicados na parte inferior de cada coluna. O marcador de massa molecular 100 bp ladder (Promega) foi resolvido em paralelo na primeira e última coluna dos géis.

2.3 Extração de DNA total

No momento em que as PCR multiplex foram iniciadas, a biblioteca de DNA total disponível para as linhagens SDF continha 250 amostras. Desta forma, para a avaliação do perfil toxigênico de todo o acervo de linhagens SDF (312), e de outras caracterizações moleculares, foram realizadas a extração de DNA total das 62 linhagens SDF que, anteriormente, apresentaram limitações de crescimento ou na obtenção do DNA genômico total. A dificuldade de cultivo das linhagens que apresentavam problema de crescimento foi contornada utilizando alíquotas novas contendo suspensão de esporos.

Como já mencionado, a parede celular rígida é característica do filo *Firmicutes* e há diversidade na composição de aminoácidos da peptidoglicano (de Vos *et al.*, 2009), característica

que torna o tratamento com lisozima e outras enzimas ineficaz em algumas linhagens (Chassy, 1976; Guariglia-Oropeza e Helmann, 2011). Dentro deste contexto, para as linhagens que impuseram limitações na extração (ou refratárias) de DNA, provavelmente em decorrência da constituição da parede celular, o tempo de tratamento com proteinase K a 55 °C foi elevado de 12 para 20 horas. Esta modificação se mostrou eficiente e o DNA total das 62 linhagens SDF restantes foi obtido.

2.4 Avaliação da presença de genes de toxinas por PCR convencional

Levando em consideração a diferença de resultados obtidos pelas duas estratégias de amplificação por PCR, e a concordância de resultados obtidos pelo sistema convencional (utilizando os quatro pares de *primers* individualmente) e aqueles obtidos pela análise por BLAST, foi decidido selecionar linhagens SDF para repetir a varredura dos quatro genes de virulência utilizando PCR convencional. Para garantir os parâmetros da reação e ser mais fiel ao protocolo descrito nos trabalhos de referência (Ehling-Schulz *et al.*, 2005a; Ehling-Schulz *et al.*, 2006), novas reações foram realizadas. Os critérios de seleção incluíram 20 linhagens SDF com genomas completos sequenciados (SDF0005, SDF0008, SDF0009, SDF0010, SDF0011, SDF0015, SDF0016, SDF0018, SDF0020, SDF0024, SDF0027, SDF0028, SDF0030, SDF0037, SDF0062, SDF0063, SDF0068, SDF0080, SDF0098, SDF0141) todas as linhagens SDF classificadas até aquele momento utilizando sequências de gene de rRNA 16S como espécies não membro do grupo do *B. cereus* e as linhagens SDF com atividade hemolítica positiva nos testes com incubação a 37 °C, totalizando 127 linhagens. As linhagens obtidas dos bancos de linhagens utilizadas como controle também foram reavaliadas por PCR convencional. A relação completa das SDF selecionadas para esta abordagem pode ser acessada na tabela S1 na seção Informação Suplementar.

A partir desta nova análise, foi observado que dez linhagens SDF e cinco linhagens controle possuem outros genes de virulência além dos obtidos na PCR multiplex. As linhagens SDF0016 e SDF0027 foram negativas para todos os genes de virulência testados por PCR multiplex e positivas para o gene *cytK* utilizando PCR convencional. As linhagens SDF0062 e SDF0169 foram positivas para *nhe* e *hbl* amplificados por PCR convencional e haviam apresentado resultado negativo para todos os genes pelo sistema de PCR multiplex. A linhagem SDF0037, que também havia sido negativa para todos os genes por PCR multiplex, foi positiva para *cytK*, *nhe* e *hbl* na abordagem por PCR convencional.

Para as linhagens SDF0056 e SDF0147, negativas para todos os genes avaliados por PCR multiplex, foram positivas para *cytK* e *nhe* por PCR convencional. As linhagens SDF0030, SDF0100 e SDF0101 foram positivas para apenas *cytK* por multiplex, mas na amplificação por PCR convencional foram positivas para *cytK*, *nhe* e *hbl*. Por fim, as linhagens controles 6A5, 6A13, 6A24, 9A2 e CCGB-IOC 1163 (Tabela 2), que haviam sido positivas para *cytK* e *nhe* por abordagem multiplex, foram positivas para *cytK*, *nhe* e *hbl* na amplificação por PCR convencional. Estes resultados estão demonstrados na figura 9.

Após a execução da PCR convencional aplicada às linhagens SDF selecionadas, adicionalmente aos resultados obtidos pela PCR multiplex, foi determinado o perfil toxigênico de 250 linhagens SDF da CBafes. Dessas, 61 linhagens (24,4%) foram positivas para, pelo menos, um dos quatro genes de virulência nas condições abordadas neste trabalho.

O perfil mais abundante na coleção foram linhagens que carregam simultaneamente os genes da citotoxina K – *cytK* – e toxina não-hemolítica – *nhe* – correspondendo a 22 (8,8%) das linhagens analisadas (Tabela 4; perfil D). O segundo perfil mais abundante foram as SDF que contém apenas o gene *cytK* (Tabela 4; perfil F), sendo 18 (7,2%) linhagens, seguido do terceiro perfil mais ocorrente, 6 (2,4%) SDF que contém os três genes – *cytK*, *nhe* e *hbl* (Tabela 4, perfil A). Cinco SDF (2%) contém os genes *nhe* e *hbl* (Tabela 4, perfil E). Três linhagens SDF (1,2%) contém os genes *cytK* e *hbl* (Tabela 4, perfil C) e 3 contém apenas o gene *nhe* (Tabela 4, perfil H). Uma linhagem carrega apenas o gene *hbl* (0,4%; Tabela 4, perfil G), uma carrega os genes *ces* e *nhe* (0,4%; Tabela 4, perfil B) e duas linhagens (0,8%) carregam apenas o gene *ces* (Tabela 4; perfil I).

Conforme esperado, a maioria das linhagens SDF positivas para pelo menos um dos quatro genes de virulência testados foram identificadas como membros do grupo do *B. cereus* por meio de sequências de genes de rRNA 16S (Orem, 2018), sendo 47 (77,04%) das 61 linhagens SDF positivas. Dentre estas, 30 foram identificadas como *B. cereus ss*, 13 como *B. thuringiensis*, 3 como *B. anthracis* e uma como *B. toyonensis*.

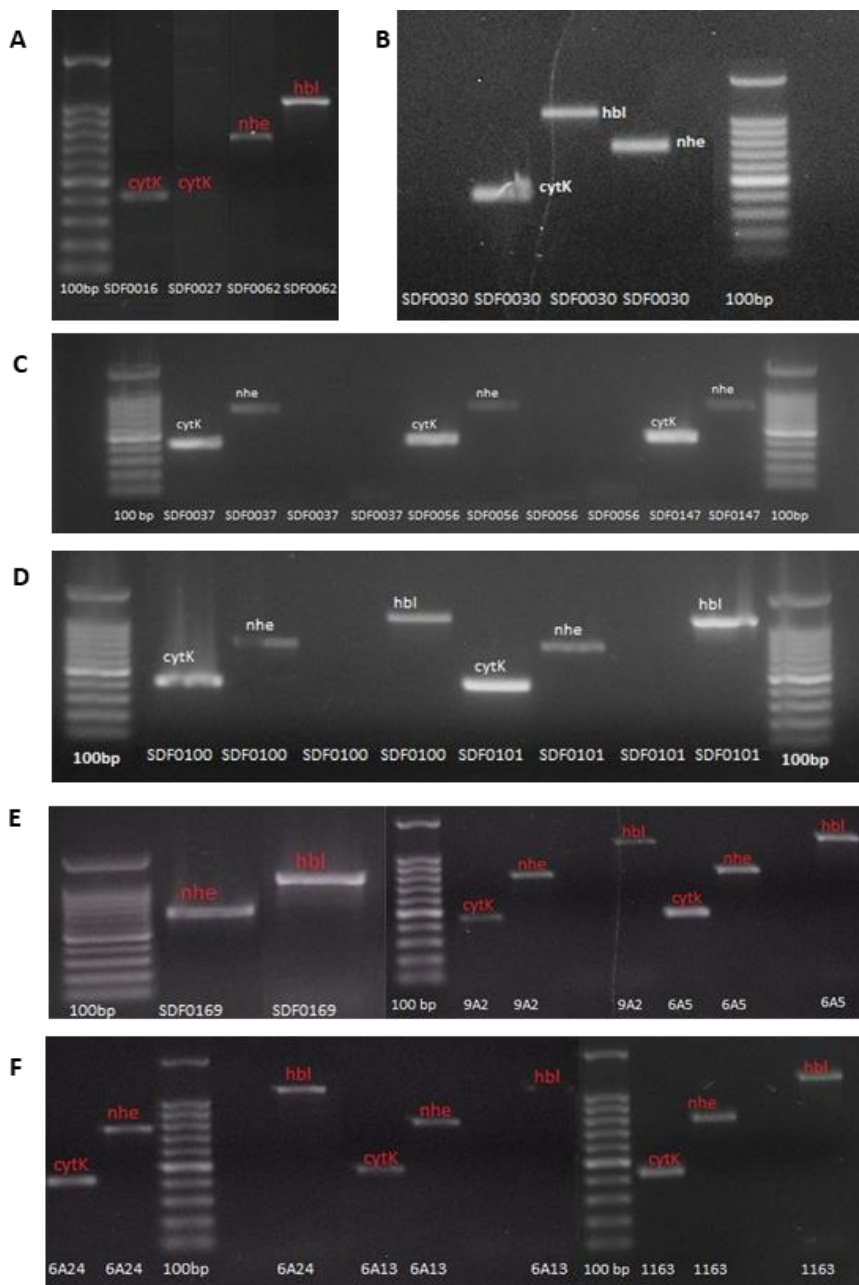


Figura 9. Divergência na amplificação de genes de virulência obtidas por PCR convencional e multiplex. Os produtos obtidos por amplificação utilizando PCR convencional foram resolvidos em gel de agarose 1%. O nome dos genes correspondentes está indicado ao lado ou acima das respectivas bandas. Os números que designam as linhagens SDF estão indicados na parte inferior de cada coluna. O marcador de massa molecular 100 bp ladder (Promega) foi resolvido em paralelo.

A alta relação molecular entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* inviabiliza a distinção entre estas por meio de sequências de genes de rRNA 16S, que apresenta entre 99-100% de identidade (Ehling-Schulz *et al.*, 2011). Atualmente as duas espécies são diferenciadas quanto à presença ou ausência de delta-endotoxinas com atividades para larvas de inseto (Ehling-Schulz e

Messelhäusser, 2013). Neste trabalho, para a classificação das espécies foi considerada a maior identidade de sequências consensos de gene de rRNA 16S (Tabela S1; Orem, 2018).

Tabela 4. Perfil toxigênico de linhagens SDF obtidos neste estudo

Perfil toxigênico	Linhagens positivas (%) para os genes-alvo*
A (<i>cytK</i> ⁺ , <i>nhe</i> ⁺ , <i>hbl</i> ⁺)	6 (2,4)
B (<i>ces</i> ⁺ , <i>nhe</i> ⁺)	1 (0,4)
C (<i>cytK</i> ⁺ , <i>hbl</i> ⁺)	3 (1,2)
D (<i>cytK</i> ⁺ , <i>nhe</i> ⁺)	22 (8,8)
E (<i>nhe</i> ⁺ , <i>hbl</i> ⁺)	5 (2,0)
F (<i>cytK</i> ⁺)	18 (7,2)
G (<i>hbl</i> ⁺)	1 (0,4)
H (<i>nhe</i> ⁺)	3 (1,2)
I (<i>ces</i> ⁺)	2 (0,80)
Total de amostras positivas	61 (24,4)

*total de amostras testadas: 250.

O alto nível de relação molecular entre estas duas espécies e a consequente impossibilidade de diferenciação no diagnóstico laboratorial de surtos alimentares é observada desde que foi detectada a presença de genes de virulência típicos de *B. cereus* em *B. thuringiensis* nos anos 1990 (Griffiths, 1990; Damgaard *et al.*, 1996). Isto sugere que alguns casos atribuídos ao *B. cereus* podem, na verdade, ter sido causados por *B. thuringiensis* (Johler, *et al.*, 2018). Adicionalmente, o uso desta espécie como bioinseticida natural levanta a questão de segurança alimentar, uma vez que as proteínas responsáveis pela ação inseticida (delta-endotoxinas: Cry e Cyt) são produzidas durante a esporulação (Bravo *et al.*, 2011). Corroborando esta afirmação, o estudo de Johler *et al.* (2018) demonstrou que linhagens de *B. thuringiensis* usadas como biopesticidas exibem toxicidade média em células Vero e que algumas destas não são diferenciáveis de linhagens envolvidas em casos de surtos alimentares.

Além das linhagens SDF que compõem a CBafes, para algumas linhagens tipo pertencentes ao grupo do *B. cereus* *sl*, utilizadas com controle (Tabela 2) neste estudo, também apresentaram resultados diferentes quando avaliadas por PCR convencional. As linhagens *B. mycoides* CCGB-IOC 6A13; *B. weihenstephanensis* CCGB-IOC 6A24, *B. cereus* CCGB-IOC 6A5 e *B. thuringiensis* var. *jegathesan* CCGB-IOC 1163 tinham sido positivas apenas para *cytK* e

nhe quando testadas por PCR multiplex. Entretanto, por PCR convencional foi observada a presença adicional do gene *hbl* nestas linhagens (Tabela S2). É importante ressaltar que já foram relatadas a presença de genes de virulência típicos de *B. cereus* ss em algumas linhagens destas espécies (Thorsen *et al.*, 2006; Johler *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2018). Os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro com estes achados.

Atualmente, o método padrão para identificação de linhagens pertencentes ao grupo do *B. cereus* em produtos alimentícios nos Estados Unidos é o cultivo em meio seletivo e/ou diferencial juntamente com testes bioquímicos (Ehling-Schulz *et al.*, 2005b; Miller *et al.*, 2018). A diferenciação rápida, eficiente e confiável entre espécies patogênicas e não patogênicas permanece sendo um desafio (Miller *et al.*, 2018). Esta limitação atinge diretamente tanto os produtores de alimentos, com destaque da indústria de laticíneos, quanto os órgãos regulatórios.

Neste trabalho, a detecção de linhagens de *B. cereus* *sl* portadoras de genes de virulência com produtos associados à intoxicação alimentar isoladas de solo reforça a possibilidade de este tipo de ambiente ser importante fonte de contaminação de alguns alimentos (Kramer e Gilbert, 1989; Andersson *et al.*, 1995). A presença de genes de virulência em *B. cereus* *sl* isolados de diversas fontes vem sendo amplamente descrita nos últimos anos, ainda que a grande maioria dos estudos seja focada em isolados de alimentos, a alta incidência de linhagens toxigênicas é um padrão que se mostra constante.

2.5 Ocorrência de genes de virulência em espécies alocadas fora do grupo do *B. cereus*

Desde a descoberta das enterotoxinas causadoras de surtos alimentares presentes no *B. cereus* *ss* no final de 1950, acreditava-se que estas eram características exclusivas desta espécie. Além disto, a escassez de métodos de identificação de microrganismos, juntamente com a falta de dados acerca de infecções alimentares de baixa complexidade contribuiu para que esta afirmação fosse tida como verdadeira. Com o passar do tempo e o desenvolvimento de novas técnicas de identificação de microrganismos, foi observado que algumas espécies membros do grupo do *B. cereus* também eram toxigênicas e causadoras de doenças. Mais recentemente, novos métodos de detecção de toxinas possibilitaram a descoberta de genes de virulência em espécies alocadas fora do *B. cereus* *sl*.

Corroborando esta afirmação, além dos resultados esperados apresentados anteriormente, após a repetição das PCR de modo convencional, foi observado que 13 (21,31%) das 61

linhagens SDF positivas para a presença de genes de virulência avaliados eram espécies não pertencentes ao grupo do *B. cereus*. Dentre estas, a linhagem SDF0016, que foi identificada como *B. simplex*, revelou-se positiva para a presença do gene *cytK*. A presença desta toxina em *B. simplex* foi demonstrada recentemente no estudo de De Bellis *et al.*, (2015), em uma linhagem isolada de sêmola de trigo, ingrediente utilizado na confecção de pães, que também continha genes *hbl* e *nhe*. Adicionalmente, o estudo de Taylor *et al.* (2005) demonstrou que um isolado de paciente de fibrose cística possuía uma toxina termoestável com padrões de purificação comparáveis aos obtido de uma linhagem de *B. cereus* produtora de *ces*.

As linhagens SDF0027, SDF0103 e SDF0147, identificadas como *B. safensis* por sequência de gene de rRNA 16S, foram positivas para *cytK*, *ces* e *cytK*, e *nhe*, respectivamente. Esta espécie foi primeiramente isolada em 2006 e apresenta maior identidade de sequência rRNA 16S com *B. pumilus* (Satomi *et al.*). Os membros do subgrupo do *B. pumilus*, que fazem parte do grupo do *B. subtilis*, possuem cerca de 99,5% de identidade de sequências de gene rRNA 16S (Alina *et al.*, 2015). Adicionalmente, a identificação das linhagens SDF0103 e SDF0147 por MALDI-TOF revelou que se trata de *B. pumilus* e *B. altitudinis*, respectivamente (Martins, 2018).

Esta alta identidade de sequências e a consequente dificuldade de diferenciar a duas espécies utilizando somente este marcador molecular pode explicar a ausência de isolados de *B. safensis* em estudos que analisam *Bacillus spp.* do solo e produtos alimentícios, sendo o *B. pumilus* mais frequentemente encontrado. Desta forma, do nosso conhecimento, até o momento não há na literatura estudos que associem o *B. safensis* às toxinas encontradas neste trabalho, mas sim, *B. pumilus*, espécie a qual já foi associada aos genes de virulência analisados neste estudo, descrito abaixo.

Identificadas como *B. pumilus*, as linhagens SDF0115, SDF0201 e SDF0207 foram positivas para os genes *ces*; *cytK* e *nhe*; e *nhe*, respectivamente. Em concordância com estes resultados, Nieminen *et al.* (2007) isolaram uma linhagem de *B. pumilus* de leite positiva para genes *ces*, codificadores de cereulídeo sintetases. O gene *nhe* também já havia sido associado à esta espécie em isolados clínicos, onde 71% carregava o gene *nheA*, 50% *nheB* e 57% *nheC* (Celandroni *et al.*, 2016). Osman *et al.* (2018) isolaram *B. pumilus* de carnes de frango, positivos para *nhe*, *hbl* e *cytK*, e carne bovina, positivos para *nhe*.

A linhagem SDF0037, identificada como *L. sphaericus* por sequências de rRNA 16S, foi positiva para os genes *cytK*, *nhe* e *hbl*. Em razão da toxicidade contra larvas de mosquitos,

inseticidas derivados desta espécie são frequentemente utilizados em controle biológico. Rojas-Pinzón e Dussán (2017) demonstraram que a presença de hemolisina D (HblD) atua na toxicidade contra as larvas de mosquito. Apesar disto, não há na literatura registro da presença de gene *hbl* em genomas desta espécie. Em concordância com este resultado, e evidenciando a importância de segurança alimentar, Osman *et al.* (2018) isolaram linhagens de *L. sphaericus* originárias de carne de frango contendo os genes *nhe* e *cytK*.

A linhagem SDF0056, identificada como *B. megaterium* por sequências de gene rRNA 16S, foi positiva para *cytK* e *nhe*. Esta espécie já havia sido associada a genes de virulência em 2001, quando Rowan *et al.* isolaram uma linhagem de fórmula infantil portadoras de genes *hblA*, *hblC* e *hblD*. De encontro ao resultado obtido neste trabalho, o estudo de Celandroni *et al.* (2016) isolou uma linhagem desta espécie de casos clínicos que é positiva para o gene *nheA*. Também, Osman *et al.* (2018) isolaram duas linhagens de *B. megaterium* de carne de frango positivas para *cytK*.

A linhagem SDF0169, identificada como *B. depressus*, foi positiva para *nhe* e *hbl*. O *B. depressus* foi primeiramente isolado de solo em um campo de girassóis na China e proposto como nova espécie em 2015 (Wei *et al.*). Não há na literatura descrição da presença de genes de toxinas nesta espécie, e nem em *B. gottheilii*, espécie com maior identidade de sequência de gene de rRNA 16S.

Identificada como *P. ginsengagri*, a linhagem SDF0227 foi positiva para os genes *nhe* e *hbl*. O isolamento e a presença de genes de virulência comumente associados ao *B. cereus* foram recentemente descritos em espécies do gênero *Paenibacillus*. Celandroni *et al.* (2016) isolaram *P. glucanolyticus*, *P. lautus* e *P. amylolyticus* e demonstram que esta última espécie porta sequência de gene *nhe*. Em outro estudo, dentre isolados originários de carne congelada importada, duas linhagens foram identificadas como *P. alvei* e eram positivas para os genes *cytK*, *nhe* e *hbl* (Osman *et al.*, 2018).

As SDF0025, identificada como *B. subtilis*, foi positiva para o gene *cytK*. O estudo de Pedersen *et al.*, (2002) isolaram uma linhagem desta espécie positiva para a toxina emética. A SDF0195, identificada, *Brevibacillus laterosporus*, também foi positiva para o gene *cytK*. Não há, no nosso conhecimento, estudos que relacionem *Brevibacillus laterosporus* aos genes de virulência comumente descritos para *B. cereus* *sl.*

Por fim, a SDF0062, que ainda está em processo de classificação, foi positiva para os genes *nhe* e *hbl*.

Dentre as 13 linhagens SDF positivas identificadas como espécies fora de *B. cereus* *sl*, os genes mais encontrados foram *cytK* (61,5%) e *nhe* (53,8%) seguido de *hbl* e *ces* (15,3%) A predominância foi semelhante nos 47 membros positivos do *B. cereus* *sl*, onde o gene mais abundante foi o *cytK* (87,2%) seguido de *nhe* (61,7%), *hbl* (25,5%) e *ces* (2,1%) (Figura 10).

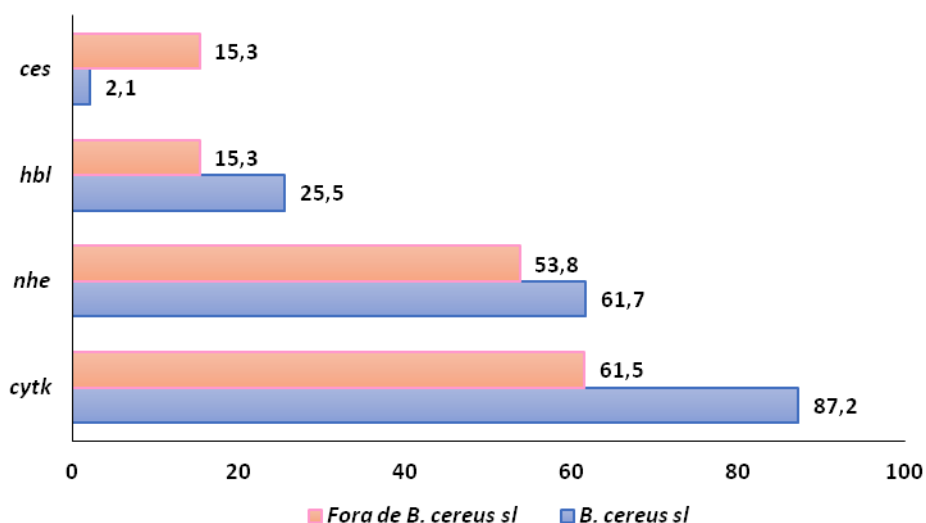


Figura 10. Prevalência de genes de virulência em linhagens SDF utilizadas neste trabalho. O percentual (%) de genes *cytK*, *nhe*, *hbl* e *ces* comparando as SDF identificadas como espécies alocadas dentro e fora do grupo do *B. cereus* está descrito ao lado das respectivas barras no gráfico para cada gene.

A linhagem tipo *G. stearothermophilus* 9A2 (Tabela 2), além dos genes *cytK* e *nhe* obtidos por PCR multiplex, foi positiva para o gene *hbl* quando submetida à PCR convencional (Tabela S2). Este resultado reforça a importância relacionada à segurança alimentar que deve ser dada a esta espécie termofílica, visto que esta é contaminante frequente de alimentos (Tai *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2007; Postollec *et al.*, 2012 Lucking *et al.*, 2013) e resistente aos processos industriais, como a pasteurização (Lucking *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a afirmação de plasticidade genômica e potencialidade de virulência de outras espécies fora do grupo do *B. cereus* (Kolsto *et al.*, 2009; Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013). Além disto, demonstram a importância de estudos que

acessem os genes causadores de infecções alimentares em outras espécies, principalmente quando levada em consideração a contaminação por estes organismos nos processos de produção e conservação de alimentos.

3. Análises das sequências de genes de virulência em linhagens SDF

Os genes de virulência obtidos por PCR foram submetidos ao sequenciamento bidirecional pelo método de Sanger a fim de avaliar o nível de identidade entre as sequências originárias de diferentes espécies. Para a avaliação da identidade das sequências, as fitas senso e anti-senso com PHRED ≥ 20 foram transformadas em sequências consenso utilizando a ferramenta CAP – Contig Assembly Program – do Bioedit e o alinhamento local realizado utilizando a ferramenta BLAST.

O gene que codifica a toxina CytK foi o mais amplificado, estando presente em 47 linhagens SDF. Dentre estas, 37 sequências apresentaram qualidade desejada em ambas as fitas e foram transformadas em sequências consenso para análise. Para duas linhagens (SDF0061 e SDF0089) apenas a sequência das fitas senso (*forward*) e outras duas (SDF0250 e SDF0300) da anti-senso (*reverse*) dos genes de virulência apresentaram qualidade adequada para a análise por BLAST (Tabela 5).

De um modo geral, todas as sequências de *cytK* amplificadas tiveram a faixa de identidade alta com sequências deste gene provenientes de espécies do grupo do *B. cereus* disponíveis no NCBI, sendo a menor 92% (SDF0303). Adicionalmente, os produtos de PCR continham tamanhos próximos ao esperado, de 421 pares de bases (pb).

Para este gene, duas linhagens SDF dentre as 37 positivas foram identificadas como espécies fora do grupo do *B. cereus*. As sequências de *cytK* das linhagens SDF0025, identificada como *B. subtilis*, e a SDF0201, identificada como *B. pumilus*, apresentaram 97% e 98% de identidade, respectivamente, com o gene da citotoxina K de *B. cereus* ss. A alta relação filogenética com o ortólogo de *B. cereus* – espécie referência para genes de virulência abordados neste trabalho – sugere a ocorrência de TGH (Ravenhall *et al.*, 2015).

A análise de evidências de THG por melhor *hit* de sequências utilizando BLAST (método filogenético implícito) é uma abordagem simples e rápida. Estas características são decorrentes, principalmente, da dispensa de construção de árvores filogenéticas (Ravenhall *et al.*, 2015). Porém, este método apresenta limitações, notadamente, pela dependência de informações

depositadas em bancos de dados (Koski e Golding, 2001) e, portanto, deve ser associada a outras técnicas.

As sequências de *cytK* das linhagens SDF0016, SDF0027, SDF0037, SDF0056, SDF0147 e SDF0283 não foram obtidas com qualidade necessária em nenhuma das duas fitas, e, portanto, não foram submetidas à análise por BLAST.

Tabela 5. Análise das sequências do gene *cytK* de linhagens SDF

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor hit	Tamanho do fragmento* (pb)
0006	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	405
0016	<i>Bacillus simplex</i> (98)	PHRED <20	ND	ND	ND
0022	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	409
0025	<i>Bacillus subtilis</i> (97)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	416
0027	<i>Bacillus safensis</i> (100)	PHRED <20	ND	ND	ND
0030	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	417
0032	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	96	<i>Bacillus cereus</i>	429
0037	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (99)	PHRED <20	ND	ND	ND
0056	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	PHRED <20	ND	ND	ND
0061	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Senso	99	<i>Bacillus cereus</i>	365
0089	<i>Bacillus anthracis</i> (100)	Senso	97	<i>Bacillus cereus</i>	199
0100	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	402
0101	<i>Bacillus cereus</i> (96)	Consenso	96	<i>Bacillus thuringiensis</i>	433
0119	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	411
0147	<i>Bacillus safensis</i> (98)	PHRED <20	ND	ND	ND
0155	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Consenso	97	<i>Bacillus thuringiensis</i>	430
0159	<i>Bacillus cereus</i> (97)	Consenso	96	<i>Bacillus cereus</i>	435

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor hit	Tamanho do fragmento* (pb)
0161	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	416
0178	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	Consenso	97	<i>Bacillus thuringiensis</i>	430
0182	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	413
0186	<i>Bacillus anthracis</i> (99)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	413
0201	<i>Bacillus pumilus</i> (97)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	416
0221	<i>Bacillus cereus</i> (96)	Consenso	97	<i>Bacillus thuringiensis</i>	414
0224	<i>Bacillus thuringiensis</i> (96)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	420
0225	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	Consenso	99	<i>Bacillus cereus</i>	376
0226	<i>Bacillus cereus</i> (96)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	415
0229	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	417
0232	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	96	<i>Bacillus cereus</i>	418
0239	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	417
0248	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Consenso	98	<i>Bacillus thuringiensis</i>	426
0249	<i>Bacillus cereus</i> (96)	Consenso	96	<i>Bacillus cereus</i>	429
0250	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Anti-senso	96	<i>Bacillus cereus</i>	320
0257	<i>Bacillus thuringiensis</i> (96)	Consenso	93	<i>Bacillus thuringiensis</i>	442
0270	<i>Bacillus cereus</i> (97)	Consenso	94	<i>Bacillus cereus</i>	412
0276	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	Consenso	96	<i>Bacillus thuringiensis</i>	435
0283	<i>Bacillus cereus</i> (100)	PHRED <20	ND	ND	ND
0286	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	95	<i>Bacillus cereus</i>	432
0288	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	418
0294	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	422

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor hit	Tamanho do fragmento* (pb)
0295	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Consenso	94	<i>Bacillus thuringiensis</i>	436
0299	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	96	<i>Bacillus thuringiensis</i>	433
0300	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Anti-senso	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	350
0301	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	Consenso	97	<i>Bacillus thuringiensis</i>	432
0303	<i>Bacillus thuringiensis</i> (97%)	Consenso	92	<i>Bacillus cereus</i>	440
0304	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	389
0305	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	426
0310	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	399

ND: Não determinado.

*Tamanho do fragmento relativo à sequência obtida utilizando a ferramenta CAP do Bioedit.

O gene *nhe* codificador da toxina não-hemolítica (Nhe) foi amplificado em 37 linhagens SDF, sendo o segundo gene mais encontrado. Dentre estas, 20 linhagens tiveram as duas sequências (senso e anti-senso) amplificadas com qualidade adequada (PHRED ≥ 20) e foram transformadas em sequências consenso para análise BLAST. Para a linhagem SDF0299 apenas a fita senso foi amplificada com qualidade para a análise e 5 (SDF0250, SDF0272, SDF0278, SDF0295 e SDF0303) tiveram apenas a fita anti-senso (Tabela 6).

Para este gene, as sequências obtidas apresentaram alta identidade com os ortólogos de espécies do grupo do *B. cereus* (Tabela 6). Com exceção da SDF0232, identificada como *B. cereus*, mas que teve maior identidade de sequência com gene *nhe* de *B. licheniformis*, de 82% em 421 pb. O tamanho esperado do produto de PCR para *nhe* é de 766 pb, próximo ao obtido na maioria das linhagens, exceto 7 sequências que foram menores que 700 pb.

As sequências das linhagens SDF0030, SDF0037, SDF0056, SDF0062, SDF0100, SDF0101, SDF0147, SDF0169, SDF0249, SDF0257 e SDF0288 não foram obtidas com qualidade suficiente para análise por BLAST.

Tabela 6. Análise das sequências do gene *nhe* das linhagens SDF

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor Hit	Tamanho do fragmento* (pb)
0030	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	PHRED <20	ND	ND	ND
0032	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	719
0037	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (99)	PHRED <20	ND	ND	ND
0053	<i>Bacillus toyonensis</i> (98)	Consenso	95	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	756
0056	<i>Bacillus megaterium</i> (99)	PHRED <20	ND	ND	ND
0062	Sem identificação	PHRED <20	ND	ND	ND
0089	<i>Bacillus anthracis</i> (100)	Consenso	93	<i>Bacillus cereus</i>	705
0100	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	PHRED <20	ND	ND	ND
0101	<i>Bacillus cereus</i> (96)	PHRED <20	ND	ND	ND
0147	<i>Bacillus safensis</i> (98)	PHRED <20	ND	ND	ND
0161	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	Consenso	94	<i>Bacillus cereus</i>	771
0169	<i>Bacillus depressus</i> (90)	PHRED <20	ND	ND	ND
0178	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	Consenso	92	<i>Bacillus cereus</i>	755
0181	<i>Bacillus anthracis</i> (100)	Consenso	96	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	757
0182	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	88	<i>Bacillus cereus</i>	776
0201	<i>Bacillus pumilus</i> (97)	Consenso	93	<i>Bacillus cereus</i>	769
0207	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	Consenso	95	<i>Bacillus cereus</i>	752
0219	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	95	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	759
0227	<i>Paenibacillus ginsengagri</i> (100)	Consenso	96	<i>Bacillus cereus</i>	722
0232	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	82	<i>Bacillus licheniformis</i>	421
0249	<i>Bacillus cereus</i> (96)	PHRED <20	ND	ND	ND
0250	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Anti-senso	96	<i>Bacillus cereus</i>	668
0257	<i>Bacillus thuringiensis</i> (96)	PHRED <20	ND	ND	ND
0272	<i>Bacillus cereus</i> (97)	Anti-senso	98	<i>Bacillus cereus</i>	310
0278	<i>Bacillus cereus</i> (97)	Anti-senso	95	<i>Bacillus cereus</i>	557
0283	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Consenso	84	<i>Bacillus cereus</i>	800
0286	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	98	<i>Bacillus cereus</i>	763
0288	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	PHRED <20	ND	ND	ND

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor <i>Hit</i>	Tamanho do fragmento* (pb)
0294	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100)	Consenso	92	<i>Bacillus cereus</i>	212
0295	<i>Bacillus cereus</i> (100)	Anti-senso	90	<i>Bacillus cereus</i>	312
0299	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Senso	94	<i>Bacillus cereus</i>	333
0300	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	82	<i>Bacillus cereus</i>	794
0301	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	Consenso	89	<i>Bacillus cereus</i>	344
0303	<i>Bacillus thuringiensis</i> (97)	Anti-senso	97	<i>Bacillus cereus</i>	699
0304	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	89	<i>Bacillus cereus</i>	332
0305	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	90	<i>Bacillus thuringiensis</i>	250
0310	<i>Bacillus cereus</i> (99)	Consenso	87	<i>Bacillus cereus</i>	775

ND: Não determinado.

*Tamanho do fragmento relativo à sequência obtida utilizando a ferramenta CAP do Bioedit.

O gene da hemolisina BL (*hbl*) foi amplificado em 17 linhagens SDF, e 9 tiveram as sequências senso e anti-senso obtidas com qualidade e transformadas em consenso para análise BLAST. Uma linhagem (SDF0257) teve apenas a sequência senso utilizada (Tabela 7). O tamanho esperado do fragmento correspondente ao gene *hbl* amplificado por PCR é 1.091 pb.

As sequências relativas a este gene apresentaram alta identidade relativo à faixa analisada de genes de espécies do grupo do *B. cereus*, sendo a menor de 87%. Com exceção da SDF0250, que apresentou maior identidade com o gene de virulência de *B. licheniformis*, com 84%. A SDF0257, identificada como *P. ginsengagri* por rRNA 16S, teve melhor *hit* BLAST com gene de *B. cereus* (90%).

A fita senso da linhagem SDF0257 foi a utilizada nesta análise. As sequências das linhagens SDF0037, SDF0062, SDF0100, SDF0101, SDF169, SDF0248 e SDF0271 não foram obtidas com qualidade suficiente para análise por BLAST.

Tabela 7. Análise das sequências do gene *hbl* das linhagens SDF

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor <i>Hit</i>	Tamanho do fragmento* (pb)
0030	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	Consenso	96	<i>Bacillus thuringiensis</i>	987

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor <i>Hit</i>	Tamanho do fragmento* (pb)
0037	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (99)	PHRED <20	ND	ND	ND
0062	Sem identificação	PHRED <20	ND	ND	ND
0100	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	PHRED <20	ND	ND	ND
0101	<i>Bacillus cereus</i> (96)	PHRED <20	ND	ND	ND
0169	<i>Bacillus depressus</i> (90)	PHRED <20	ND	ND	ND
0219	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	97	<i>Bacillus cereus</i>	1030
0227	<i>Paenibacillus ginsengagri</i> (100)	Consenso	90	<i>Bacillus cereus</i>	834
0235	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98)	Consenso	89	<i>Bacillus thuringiensis</i>	830
0239	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	87	<i>Bacillus cereus</i>	175
0248	<i>Bacillus cereus</i> (100)	PHRED <20	ND	ND	ND
0249	<i>Bacillus cereus</i> (96)	Consenso	95	<i>Bacillus cereus</i>	291
0250	<i>Bacillus cereus</i> (98)	Consenso	84	<i>Bacillus licheniformis</i>	861
0257	<i>Bacillus thuringiensis</i> (96)	Senso	93	<i>Bacillus cereus</i>	192
0271	Sem identificação	PHRED <20	ND	ND	ND
0272	<i>Bacillus cereus</i> (97)	Consenso	87	<i>Bacillus cereus</i>	775
0276	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99)	Consenso	89	<i>Bacillus cereus</i>	275

ND: Não determinado.

*Tamanho do fragmento relativo à sequência obtida utilizando a ferramenta CAP do Bioedit.

Por fim, o gene da cereulídeo sintetase (*ces*) foi amplificado em 3 linhagens SDF e apenas a fita anti-senso foi obtida com qualidade para análise por BLAST (Tabela 8). O tamanho do fragmento de PCR esperado para este gene é de 1.271 pb.

A sequência da fita anti-senso de *ces* da SDF0115, identificada como *B. pumilus* por sequência do gene rRNA 16S, teve identidade de 96% com o ortólogo de *B. safensis*. Como dito anteriormente, estas duas espécies são altamente relacionadas, com alta identidade de sequência rRNA 16S (99%) e, portanto, não podem ser distinguidas por este método.

As sequências das SDF0103 e SDF0181 não foram obtidas com qualidade suficiente para análise por BLAST.

Tabela 8. Análise das sequências do gene *ces* das linhagens SDF

SDF	Identificação rRNA 16S (%)	Sequência	ID BLAST (%)	Melhor <i>Hit</i>	Tamanho do fragmento* (pb)
0103	<i>Bacillus safensis</i> (98)	PHRED <20	ND	ND	ND
0115	<i>Bacillus pumilus</i> (99)	Anti-senso	96	<i>Bacillus safensis</i>	656
0181	<i>Bacillus anthracis</i> (100)	PHRED <20	ND	ND	ND

ND: não determinado.

*Tamanho do fragmento relativo à sequência obtida utilizando a ferramenta CAP do Bioedit.

4. Classificação de linhagens SDF baseada em sequências de genes de rRNA 16S

As linhagens SDF da CBafes estão em processo de caracterização polifásica. Este processo inclui metodologias de microbiologia clássica, sequências de gene rRNA 16S, genomas completos, perfil bioquímico, MALDI-TOF MS, ultraestrutura de esporos, entre outros (Cavalcante *et al.*, 2018; Martins, 2018; Orem, 2018). A fim de complementar a identificação do acervo de linhagens SDF (SDF0001-0312), que o nosso grupo realizou anteriormente, baseada em sequências de gene de rRNA 16S e ampliar o conhecimento acerca dos genes de virulência em espécies de bafes, 75 linhagens SDF foram identificadas durante este trabalho.

VI. Considerações Finais

O presente trabalho teve como objetivo acessar o perfil de genes de virulência associado ao potencial patogênico de Bafes isoladas de solo do DF, grupo que compreende algumas espécies de bactérias responsáveis pela contaminação de produtos alimentícios e causadoras de surtos de intoxicação alimentar.

Considerando os problemas de segurança alimentar, os resultados obtidos indicam o potencial patogênico de espécies dentro e fora do grupo do *B. cereus*. Dentre as 250 linhagens SDF testadas, 61 foram positivas para um ou mais genes de virulência abordados neste trabalho, e 13 foram identificadas como espécies fora do *B. cereus* *sl.* Dentre as linhagens positivas, espécies que merecem atenção especial na indústria em razão das condições ótimas de crescimento e capacidade de sobrevivência, como *B. weihenstephanensis* e *G. stearotermophilus*.

Estes resultados evidenciam a necessidade de atenção a este grupo de bactérias nos variados níveis de produção e conservação de alimentos, e, também, do desenvolvimento das técnicas de detecção de patógenos e toxinas. Portanto, comprovam que espécies de Bafes fora do grupo do *B. cereus* devem ser consideradas de risco de saúde pública aos consumidores, tanto quanto as espécies de *B. cereus* *sl.*

VII. Informação Suplementar

Tabela S1. Perfil toxigênico das linhagens SDF. As 250 linhagens SDF utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto à atividade hemolítica em ágar sangue e presença de genes de virulência, por PCR.

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0001	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356287	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0002	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	MH356288	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0003	<i>Bacillus subtilis</i> (97%)	MH356289	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0004	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356290	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0005	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (98%)	MH356291	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0006	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH356292	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0007	<i>Bacillus circulans</i> (99%)	MH356293	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0008	<i>Paenibacillus alvei</i> (99%)	MH356294	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0009	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	MH356295	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0010	<i>Bacillus clausii</i> (99%)	MH356296	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0011	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356297	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0012	<i>Bacillus clausii</i> (99%)	MH569343	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0013	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	MH356298	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0014	<i>Brevibacillus borstelensis</i> (96%)	MH356299	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0015	<i>Bacillus oleronius</i> (99%)	MH356300	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0016	<i>Bacillus simplex</i> (98%)	MH356301	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
SDF0017	<i>Bacillus altitudinis</i> (99%)	MH356302	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0018	<i>Bacillus clausii</i> (100%)	MH356303	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0019	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (97%)	MH356304	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0020	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (100%)	MH356305	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0021	<i>Bacillus pumilus</i> (94%)	MH569344	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0022	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	MH356306	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0023	<i>Paenibacillus alvei</i> (99%)	MH569345	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0024	<i>Bacillus simplex</i> (95%)	MH569346	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0025	<i>Bacillus subtilis</i> (97%)	MH569347	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0026	<i>Bacillus pumilus</i> (97%)	MH356307	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0027	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	MH356308	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
SDF0028	<i>Paenibacillus alvei</i> (100%)	MH356309	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0029	<i>Bacillus aryabhattai</i> (99%)	MH356310	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0030	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	MH356311	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
SDF0032	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH356312	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0033	ND	ND	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0034	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356313	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0035	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356314	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0036	<i>Bacillus altitudinis</i> (99%)	MH569315	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0037	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (99%)	MH356316	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
SDF0038	ND	ND	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0043	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356317	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0044	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356318	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0046	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356319	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0047	<i>Bacillus megaterium</i> (98%)	MH356320	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0049	<i>Bacillus aryabhattai</i> (99%)	MH356321	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0050	<i>Bacillus megaterium</i> (98%)	MH356322	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0051	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356323	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0052	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356324	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0053	<i>Bacillus toyonensis</i> (98%)	MH356325	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0054	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356326	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0055	<i>Bacillus aryabhattai</i> (98%)	MH356327	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0056	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356328	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
SDF0057	<i>Bacillus megaterium</i> (98%)	MH356329	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0060	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356330	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0061	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356331	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0062	ND	ND	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG
SDF0063	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (99%)	MH356333	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0064	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356334	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0065	<i>Bacillus aryabhattai</i> (98%)	MH356335	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0066	<i>Rummeliibacillus pycnus</i> (96%)	MH356336	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0068	<i>Bacillus simplex</i> (100%)	MH356337	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0069	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356338	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0070	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356339	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0071	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH356340	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0072	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH569350	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0074	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356341	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0075	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	MH356342	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0076	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356343	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0078	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356344	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0079	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH356345	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0080	<i>Paenibacillus alvei</i> (99%)	MH356346	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0082	<i>Bacillus aryabhattai</i> (99%)	MH356347	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0084	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356348	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0086	<i>Bacillus aryabhattai</i> (98%)	MH356349	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0087	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356350	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0089	<i>Bacillus anthracis</i> (100%)	MH356351	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0090	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH569352	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0091	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356352	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0092	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH356353	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0093	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	MH356354	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0094	<i>Bacillus megaterium</i> (98%)	MH356355	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0095	<i>Bacillus megaterium</i> (100%)	MH356356	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0096	<i>Bacillus megaterium</i> (100%)	MH356357	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0097	<i>Bacillus megaterium</i> (98%)	MH356358	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0098	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356359	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0099	<i>Bacillus megaterium</i> (97%)	MH356360	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0100	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98%)	MH569353	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
SDF0101	<i>Bacillus cereus</i> (96%)	MH569354	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
SDF0102	<i>Bacillus pumilus</i> (96%)	MH356361	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0103	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356362	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0104	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356363	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0105	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356364	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0106	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	MH356365	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0108	<i>Bacillus pumilus</i> (94%)	MH569355	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0110	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (100%)	MH356366	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0112	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356367	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0113	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH569356	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0114	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH569357	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0115	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356368	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS
SDF0117	<i>Bacillus altitudinis</i> (92%)	MH356369	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0118	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356370	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0119	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	MH356371	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0120	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356372	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0121	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356373	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0122	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	MH356374	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0123	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356375	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0124	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH569359	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0125	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356376	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0126	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356377	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0127	<i>Bacillus siamensis</i> (98%)	MH356378	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0128	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)	ND	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0129	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356379	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0130	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356380	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0131	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356381	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0132	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356382	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0133	<i>Paenibacillus alvei</i> (99%)	MH356383	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0134	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	MH356384	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0135	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356385	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0136	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356386	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0137	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356387	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0138	<i>Bacillus pumilus</i> (95%)	MH356388	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0139	<i>Bacillus pumilus</i> (94%)	MH569360	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0140	<i>Bacillus pumilus</i> (97%)	MH569361	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0141	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356389	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0142	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356390	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0143	<i>Bacillus pumilus</i> (94%)	MH356391	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0144	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	MH356392	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0145	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356393	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0146	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH356394	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0147	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356395	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
SDF0148	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356396	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0149	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356397	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0150	<i>Bacillus velezensis</i> (100%)	MH356398	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0151	<i>Bacillus safensis</i> (99%)	MH356399	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0152	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356400	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0153	<i>Bacillus altitudinis</i> (99%)	MH569362	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0154	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH569363	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0155	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	MH356401	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0156	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356402	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0157	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356403	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0159	<i>Bacillus cereus</i> (97%)	MH356404	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0160	<i>Bacillus arbutinivorans</i> (97%)	MH356405	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0161	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	MH356406	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0162	<i>Paenibacillus susongensis</i> (99%)	MH356407	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0163	<i>Bacillus australimaris</i> (98%)	MH356408	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0164	<i>Paenibacillus alvei</i> (99%)	MH356409	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0169	<i>Bacillus depressus</i> (90%)	ND	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG
SDF0171	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH569364	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0172	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> (90%)	MH569365	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0173	<i>Bacillus pumilus</i> (98%)	MH356410	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0175	<i>Bacillus pumilus</i> (97%)	MH569366	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0176	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356412	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0177	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356413	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0178	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98%)	MH356414	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0179	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356415	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0180	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (98%)	MH569367	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0181	<i>Bacillus anthracis</i> (100%)	MH569368	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0182	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH569369	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0184	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356416	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0186	<i>Bacillus anthracis</i> (99%)	MH356417	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0187	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356418	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0188	<i>Brevibacillus agri</i> (99%)	MH569370	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0190	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356419	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0191	<i>Terribacillus goriensis</i> (100%)	MH356420	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0194	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH356421	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0195	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (99%)	MH569371	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
SDF0196	<i>Bacillus safensis</i> (98%)	MH356422	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0197	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (99%)	MH356423	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0198	<i>Bacillus pumilus</i> (100%)	MH356424	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0199	<i>Bacillus anthracis</i> (97%)	MH356425	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0200	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH569372	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0201	<i>Bacillus pumilus</i> (97%)	MH356426	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
SDF0203	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (90%)	MH569374	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0204	<i>Bacillus altitudinis</i> (97%)	MH356427	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0205	<i>Bacillus altitudinis</i> (97%)	MH356428	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0206	<i>Bacillus cereus</i> (97%)	MH356429	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0207	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH569375	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
SDF0208	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH569376	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0209	ND	ND	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0212	<i>Paenibacillus chibensis</i> (96%)	MH569377	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0213	<i>Paenibacillus alvei</i> (97%)	MH356430	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0215	<i>Paenibacillus lautus</i> (96%)	MH356431	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0216	<i>Bacillus senegalensis</i> (98%)	MH569379	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0218	<i>Brevibacillus brevis</i> (98%)	ND	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0219	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH356432	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0220	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (99%)	MH356433	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0221	<i>Bacillus cereus</i> (96%)	MH569380	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0223	ND	ND	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0224	<i>Bacillus thuringiensis</i> (96%)	ND	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0225	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	MH569381	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0226	<i>Bacillus cereus</i> (96%)	MH356434	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0227	<i>Paenibacillus ginsengagri</i> (100%)	MH569382	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG
SDF0228	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356435	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0229	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH356436	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0230	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356437	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0231	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356438	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0232	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH569383	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0233	<i>Bacillus aryabhatai</i> (98%)	MH356439	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0235	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98%)	MH356440	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0236	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	MH356441	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0239	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH569384	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0240	<i>Paenibacillus terrigena</i> (97%)	MH356443	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0242	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH569385	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0244	<i>Bacillus megaterium</i> (98%)	MH569386	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0245	<i>Bacillus megaterium</i> (97%)	MH569387	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0246	<i>Bacillus aryabhattai</i> (99%)	MH356444	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0248	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	MH569388	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0249	<i>Bacillus cereus</i> (96%)	MH356445	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0250	<i>Bacillus cereus</i> (98%)	MH356446	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0251	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (98%)	MH569389	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0253	ND	ND	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0254	<i>Bacillus subterraneus</i> (97%)	MH569390	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0255	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (93%)	MH569391	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0256	<i>Bacillus subterraneus</i> (99%)	MH569392	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0257	<i>Bacillus thuringiensis</i> (96%)	MH356447	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0259	<i>Paenibacillus chibensis</i> (98%)	MH356448	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0265	<i>Paenibacillus lautus</i> (98%)	MH356449	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0269	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (98%)	MH569394	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0270	<i>Bacillus cereus</i> (97%)	MH569395	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0271	ND	ND	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0272	<i>Bacillus cereus</i> (97%)	MH569396	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0273	<i>Bacillus pumilus</i> (97%)	MH569397	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0276	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	MH356450	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0277	<i>Bacillus megaterium</i> (97%)	MH356451	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0278	<i>Bacillus cereus</i> (97%)	MH356452	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0279	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99%)	MH356453	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0280	<i>Bacillus velezensis</i> (99%)	MH356454	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0281	<i>Bacillus safensis</i> (100%)	MH356455	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0282	<i>Bacillus tequilensis</i> (99%)	MH356456	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0283	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	MH356457	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0284	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	MH356458	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0285	<i>Bacillus subtilis</i> (99%)	MH356459	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0286	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356460	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0287	<i>Bacillus velezensis</i> (99%)	MH356461	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0288	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	MH356462	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0291	<i>Bacillus aryabhattai</i> (98%)	MH569398	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0292	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	MH356463	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
SDF0294	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	MH356464	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0295	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	MH356465	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0297	<i>Bacillus kochii</i> (99%)	MH356466	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0298	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	MH356467	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0299	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356468	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0300	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356469	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0301	<i>Bacillus thuringiensis</i> (98%)	MH356470	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0302	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (98%)	MH356471	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0303	<i>Bacillus thuringiensis</i> (97%)	MH356472	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D

Linhagem	Identificação de maior identidade (%)	Número de Acesso*	Hemólise 28 °C	Hemólise 37 °C	PCR multiplex				PCR convencional			
					<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
SDF0304	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356473	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0305	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356474	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0308	<i>Bacillus simplex</i> (97%)	MH356475	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0309	<i>Bacillus megaterium</i> (95%)	MH356476	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0310	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	MH356477	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0311	<i>Bacillus megaterium</i> (96%)	MH356478	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	N/D	N/D	N/D	N/D
SDF0312	<i>Bacillus pumilus</i> (96%)	MH356479	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

*NCBI. N/D: não determinado.

Tabela S2. Perfil toxigênico de linhagens tipo utilizadas como controle neste trabalho

Linhagem tipo	Origem	PCR multiplex				PCR convencional			
		<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> 1A1	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> 13A10 / ATCC 12123	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> 19A1 / ATCC 7055T	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Paenibacillus macerans</i> 22A1	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Rummeliibacillus pycnus</i> 24A1	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Brevibacillus brevis</i> 26A1 / ATCC 8246	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Brevibacillus formosus</i> 26A2	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Paenibacillus alvei</i> 33A1	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Brevibacillus laterosporus</i> 40A1 / ATCC 9141	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Brevibacillus centrosporus</i> 42A1	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Bacillus mycoides</i> 6A13	BGSC	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> 6A24	BGSC	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
<i>Bacillus cereus</i> 6A45	BGSC	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS
<i>Bacillus cereus</i> 6A5 / ATCC 14579	BGSC	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> 80A1	BGSC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 9A2	BGSC	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
<i>Bacillus licheniformis</i> CCGB-IOC 0407	IOC-RJ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Bacillus circulans</i> CCGB-IOC 0411	IOC-RJ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>marrisoni</i> CCGB-IOC 0780	IOC-RJ	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG
<i>Brevibacillus laterosporus</i> CCGB-IOC 0780	IOC-RJ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i> CCGB-IOC 1163	IOC-RJ	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
<i>Bacillus subtilis</i> CCGB-IOC 1249	IOC-RJ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Tabela S3. Sequências utilizadas para análise por BLAST em 20 linhagens SDF com genoma completo sequenciado

Gene	Gene ID	Espécie	Gene	Gene ID	Espécie	
nhe	2855045	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>	cytK	2856378	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>	
	31629979	<i>Bacillus thuringiensis</i>		6382833	<i>Bacillus cereus</i>	
	31629981	<i>Bacillus thuringiensis</i>		6382791	<i>Bacillus cereus</i>	
	31629879	<i>Bacillus thuringiensis</i>		ces	6382974	<i>Bacillus cereus</i>
hbl	29686981	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518	6382312		<i>Bacillus cereus</i>	
	2858099	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>	esfingomielinase		1085901	<i>Bacillus anthracis</i> str. <i>Ames</i>
	2855865	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>			2848805	<i>Bacillus anthracis</i> str. <i>Sterne</i>
	2854497	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>		cereolisina	29680932	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518
	2854193	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>			2854193	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>konkukian</i>
nrps	34879183	<i>Brevibacillus laterosporus</i>			3251461	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM
	HlyII	1205868	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	plcr	1207690	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
1204545		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	1203430		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	
HlyIII	1207789	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579				

VIII. Referências Bibliográficas

- Agata N.; Mori M.; Ohta M.; Suwan S.; Ohtani I.; Isobe M. **A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells.** FEMS Microbiol Lett v.121 p.31–34, 1994.
- Agata N, Ohta M, Mori M e Isobe M. **A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*.** FEMS Microbiol Lett, v.129, p.17–20, 1995.
- Alina SO, Constantinescu F, Petruța CC. **Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection.** Romanian Biotechnological Letters. V.20, n.5, p.10737-10750, 2015.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. **Basic local alignment search tool.** J Mol Biol. v.215, n.3, p.403-10, 1990.
- Arnesen, L. P. S.; Fagerlund, A. e Granum, P.E. **From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.** FEMS Microbiol Rev, v.32, p.579–606, 2008.
- Andersson A.; Ronner U., Granum P.E. **What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?** Int J Food Microbiol v.28, p.145–155, 1995.
- Andersson, A.; Granum P.E.; Ronner, U. **The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism.** Int J Food Microbiol. v.39, p.93–99, 1998a.
- Baik, K.S.; Park, S.C.; Kim, E.M.; Bae, K.S.; Ahn, J.H.; Ka, J.O.; Chun, J.; Seong C.N. **Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland.** J. Microbiol. 46, 647–655, 2008.
- Beneduzi A, Peres D, da Costa PB, Bodanese Zanettini MH, Passaglia LMP. **Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil.** Res Microbiol. v.159, p.244–250, 2008b.
- Berka, R.M.; Hahn, J.; Albano, M.; Draskovic, I.; Persuh, M.; Cui, X.; Sloma, A.; Widner, W.; Dubnau, D. **Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK.** Mol Microbiol. v.43, n.5, p.1331–45, 2002.
- Bhalla, A.; Kainth, A.S.; Sani, R.K. **Draft genome sequence of lignocellulose degrading thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. strain WSUCF1.** Genome Announc., v.1, n.4, e00595-132013.
- Boonmark, C.; Takahasi, Y.; Morikawa, M. **Draft genome sequence of *Geobacillus thermoleovorans* strain B23.** Genome Announc. v.1, n.6, e00944-13, 2013.
- Bouillaut, L.; Perchat, S.; Arold, S.; Zorrilla, S.; Slamti, L.; Henry, C.; Gohar, M.; Declerck, N.; Lereclus, D. **Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides.** Nucleic Acids Res., v.36, p.3791–3801, 2008.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., and Soberón, M. ***Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide.** Insect Biochem. Mol. Biol. v.41, p.423–431, 2011.
- Brillard, J.; Lereclus, D. **Comparison of cytotoxin *cytK* promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *B. cereus* food-poisoning strain.** Microbiology, v.150, p.2699–2705, 2004.
- Burgess, S.A.; Flint. S.H.; Lindsay, D.; Cox, M.P.; Biggs, P.J. **Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles.** BMC Microbiology. v.17, p.140, 2017.
- Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I.C., Böhme, K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P. **Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes.** Food Microbiol. v.46, p.288–98, 2015.

- Cardazzo, B., Negrisolo, E., Carraro, L., Alberghini, L., Patarnello, T., Giaccone, V. **Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates.** Appl Environ Microbiol. v.74, p.850–60, 2008.
- Cavalcante, D.A.; De-Souza, M. T.; de Orem, J. C.; de Magalhães, M. I.; Martins, P. H.; Boone, T. J.; Castillo, J. A; Driks, A. **Ultrastructural analysis of spores from diverse *Bacillales* species isolated from Brazilian soil.** Environmental Microbiology Reports, 2018.
- Celandroni, F.; Salvetti, S.; Gueye, S.A.; Mazzantini, D.; Lupetti, A.; Senesi, S.; Ghelardi, E. **Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates.** Plos One, v.11, n.3, 2016.
- Ceuppens, S.; Rajkovic, A.; Heyndrickx, M.; Tsilia, V.; van de Wiele, T.; Boon, N.; Uyttendaele, M. **Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications.** Crit. Rev. Microbiol. v.37, p.188–213, 2011.
- Chao WL, Hsu SF. **Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria.** Soil Biol Biochem. v.36, p.479–487, 2004.
- Chaves, J.Q.; de Paiva, E.P.; Rabinovitch, L.; Vivoni, A.M. **Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Food Protection, v.80, n.7, p.1060–1065, 2017.
- Chassy, B.M. **A gentle method for the lysis of oral streptococci.** Biochem Biophys Res Commun. v.68, n.2, p.603-8, 1976.
- Cheneby D, Philippot L, Hartmann A, He´nault C, Germon J-C. **16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils.** FEMS Microbiol Ecol. v.34, p.121–128, 2000.
- Christie, G. **Inition of Germination in *Bacillus* and *Clostridium* Spores.** In E. Abel-Santos: Bacterial spores (89-106). Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2012.
- Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C e Schmitt P. **Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach.** J Appl Microbiol. v.97, p.214–219, 2004.
- Claverys, J.P.; Martin, B.; Polard, P. **The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism.** FEMS Microbiol Rev. v.33, n.3, p.643-56, 2009.
- Colwell, R.R. **Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species.** J Bacteriol. v.104, p.410–433, 1970.
- Couto CRA, Alvarez VM, Marques JM, de Azevedo Jurelevicius D, Seldin L. **Exploiting the aerobic endospore-forming bacterial diversity in saline and hypersaline environments for biosurfactant production.** BMC Microbiol. v.15, p.240, 2015.
- Cui, Y.; Liu, X; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Cao, J.; Ding, S.; Zhu, K. **Characterization of *Bacillus cereus* isolates from local dairy farms in China.** FEMS Microbiol Lett. v.363, n.12, 2016.
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J., and Jørgensen, K. **Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food.** Lett. Appl. Microbiol. v.23, p.146–150, 1996.
- De Bellis, P., Minervini, F., Di Biase, M., Valerio, F., Lavermicocca, P., Sisto, A. **Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients.** Int. J. of Food Microbiology. v.197, p.30-39, 2015.
- Dessimoz, C., Daniel, M., Gonnet, G.H. **DLIGHT—Lateral Gene Transfer Detection Using Pairwise Evolutionary Distances in a Statistical Framework.** Springer, v. 4955, p.315–330, 2008.

- de Vos, P; Garrity, G; Jones, D; Krieg, N.R; Ludwig, W; Rainey, F.A; Schleifer, K.-H; Whitman, W.B. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. V. 3: The Firmicutes. Second Ed, 2009
- Dierick, K.; Van Coillie, E.; Swiecicka, I.; Meyfroidt, G.; Devlieger, H.; Meulemans, A.; Hoedemaekers, G.; Fourie, L.; Heyndrickx, M.; Mahillon, J. **Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning**. J Clin Microbiol. v.43, p.4277–4279, 2005.
- Doll, V.M.; Ehling-Schulz, M.; Vogelmann, R. **Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus***. Plos One, v.8, n.4, 2013.
- Dommel, M.K., Lücking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. **Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus***. Food Microbiol. v.28, n.2, p.284-90, 2011.
- Driks, A. **The *Bacillus subtilis* spore coat**. Microbiol Mol Biol Rev 63, 1–20, 1999.
- Dwivedi, G.R.; Sharma, E.; Rao, D.N. ***Helicobacter pylori* DprA alleviates restriction barrier for incoming DNA**. Nucleic Acids Res. v.41, n.5, p.3274-88, 2013.
- Ehling-Schulz M.; Svensson B.; Guinebretiere MH.; *et al.* **Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains**. Microbiology v.151, p.183–197, 2005a.
- Ehling-Schulz, M.; Vukov, N.; Schulz, A.; Shaheen, R.; Andersson, M.; Martlbauer, E.; Scherer, S. **Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus***. *Appl Environ Microbiol*, v.71, n.1, p.105-113, 2005b.
- Ehling-Schulz, M.; Guinebretière, M.-H.; Monthán, A.; Berge, O.; Fricker, M.; Svensson, B. **Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus***. FEMS Microbiol Letters, n. 260, p. 232-240, 2006a.
- Ehling-Schulz, M., Knutsson, R., and Scherer, S. **“*Bacillus cereus*,” in Genomes of Foodborne and Waterborne Pathogens**, eds P. Fratamico, Y. Liu, and S. Kathariou (Washington, DC: ASM Press), 147–164, 2011.
- Ehling-Schulz, M.; Messelhäusser, U. ***Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling**. Frontiers in Microbiology, n. 4, p. 1-8, 2013.
- Fagerlund, A.; Ween, O.; Lund, T.; Hardy, S.P.; Granum, P.E. **Genetic and functional analysis of the *cytK* family genes in *Bacillus cereus***. Microbiology, v.150, p.2689–2697, 2004.
- Fagerlund, A.; Brillard, J.; Fürst, R.; Guinebretière, M.H.; Granum, P.E. **Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group**. BMC Microbiol. v.7, n.43, 2007.
- Fard, R. M.N.; Barton, M. D.; Heuzenroeder, M. W. **Bacteriophage mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci**. Lett. Appl. Microbiol. v.52, p.559–564, 2011.
- Fekete, T. *Bacillus species (not anthracis)*. Clinical Microbiology Newsletter, v.31:12 2009.
- Feng, L.; Wang, W.; Cheng, J.; Ren, Y.; Zhao, G, *et al.* **Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir**. Proc Natl Acad Sci U S A. v.104, p.5602–7, 2007.
- Fiedoruk, K., Daniluk, T., Fiodor, A., Drewicka, E., Buczynska, K., Leszczynska, K., Bideshi, D.K., Swiecicka, I. **MALDI-TOF MS portrait of emetic and non-emetic *Bacillus cereus* group members**. Electrophoresis. v.15-16, p.2235-47, 2016.
- Frenzel, E., Letzel, T., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. **Inhibition of cereulide toxin synthesis by emetic *Bacillus cereus* via long-chain polyphosphates**. Appl Environ Microbiol. v.77, n.4, p.1475-82, 2011.
- From, C.; Pukall, R.; Schumann, P.; Hormazábal, V.; Granum, P.E. **Toxin-Producing Ability among *Bacillus* spp**. Applied and Environmental Microbiology, v.17, n.3, p.1178–1183, 2005.

- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., and Dantas, G. **The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens.** *Science*. v.337, p.1107–1111, 2012.
- Fritze, D. **Bacillus Identification-Traditional Approaches.** In: Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N. and Vos, P. (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, Blackwell Publishing, Cambridge, pp 100-123, 2002.
- Fritze, D. **Taxonomy of the genus Bacillus and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria.** *Phytopathology* 94:1245-1248, 2004.
- Fujita, M; Losick, R. **The master regulator for entry into sporulation in Bacillus subtilis becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division.** *Genes and development*, 17: 1166-1174, 2003.
- Galperin, M.Y. **Genome diversity of spore-forming Firmicutes.** *Microbiol Spectrum* 1(2): TBS-0015-2012, 2013.
- Gao T.; Ding Y.; Wu Q.; Wang J.; Zhang J.; Yu S.; Yu P; Liu C.; Kong L.; Feng Z.; Chen M.; Wu S.; Zeng H. and Wu H. **Prevalence, virulence Genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of Bacillus cereus isolated from pasteurized milk in China.** *Front. Microbiol.* v.9, p.533, 2018.
- Gibbons, N.E. and Murray, R.G.E. **Proposals concerning the higher taxa of bacteria.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 1–6, 1978.
- Gilmore, M.S.; Cruz-Rodz, A.L.; Leimeister-Wächter, M.; Kreft, J.; Goebel, W. **A Bacillus cereus cytotoxic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: Nucleotide sequence and genetic linkage.** *J. Bacteriol.* v.171, p.744–753, 1989.
- Giorno, R; Bozue, J; Cote, C; Wenzel, T; Sulayman, M; Krishna, M; Michael, R.M; Wang, R; Zielke, R.R; Maddock, J; Friedlander, A; Welkos, S. and Driks, A. **Morphogenesis of the Bacillus anthracis Spore.** *Journal of bacteriology*, v.189, p.691–705, 2007.
- Gohar, M.; Faegri, K.; Perchat, S.; Ravnum, S.; Økstad, O.A.; Gominet, M.; Kolstø, A.B.; Lereclus, D. **The PlcR virulence regulon of Bacillus cereus.** *PLoS One.* v.3, e2793, 2008.
- Gominet, M.; Slamti, L.; Gilois, N.; Rose, M.; Lereclus, D. **Oligopeptide permease is required for expression of the Bacillus thuringiensis plcR regulon and for virulence.** *Mol. Microbiol.*, v.40, p.963–975, 2001.
- González, J.M., Carlton, B.C. **Plasmid transfer in Bacillus thuringiensis.** In: Streips UN, Goodgal SH, Guild WR, Wilson GA (eds) *Genetic exchange: a celebration and a new generation.* Marcel Dekker, NY, pp 85–95.
- Granum, P.E. *Bacillus cereus.* *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (Doyle MP e Beuchat LR, eds), pp. 445–455. ASM Press, Washington, DC, 2007.
- Griffiths, F. **The Significance of Pneumococcal Types.** *J Hyg (Lond).* v.27, n.2, p.113-59, 1928.
- Griffiths, M. W. **Toxin production by psychrotrophic Bacillus spp. present in milk.** *J. Food Prot.* v.53, p.790–792, 1990.
- Guariglia-Oropeza, V.; Helmann, J.D. **Bacillus subtilis $\sigma(V)$ confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan O-acetylation and D-alanylation of teichoic acids.** *J Bacteriol.* v.193, n.22, p. 6223-32, 2011.
- Guindon, S., Perrière, G. **Intragenomic base content variation is a potential source of biases when searching for horizontally transferred genes.** *Mol Biol Evol.* v.18, n.9, p.1838-40, 2001.
- Guinebretiere, M.H.; Fagerlund, A.; Granum, P.E.; Nguyen-The, C. **Rapid discrimination of cytK-1 and cytK-2 genes in Bacillus cereus strains by a novel duplex PCR system.** *FEMS Microbiol. Lett.* v. 259, p.74–80, 2006.
- Guinebretiere, M.H.; Auger, S.; Galleron, N.; Contzen, M.; de Sarrau, B.; Debuyser, M.L.; Lamberet, G.; Fagerlund, A.; Granum, P.E.; Lereclus, D.; *et al.* **Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel**

- thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.63, p. 31–40, 2013.
- Hardy, S. P., Lund, T. e Granum, P. E. **CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia.** *FEMS Microbiol Lett.* v.197, p.47–51, 2001.
- Hauge, S. **Food poisoning caused by *Bacillus cereus*.** *Nord Hyg Tidsskr* v.31, p.189–206, 1950.
- Hayashi, H.; Sakamoto, M.; Benno, Y. **Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in healthy subjects.** *Microbiol Immunol.* v.48, n.1, p.1-9, 2004.
- Heini, N.; Stephan, R.; Ehling-Schulz, M.; Johler, S. **Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products.** *International Journal of Food Microbiology.* v.283, p.59–64, 2018.
- Hilbert, D. W. and Piggot, P.J. **Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation.** *Microbiol and Mol Biol Reviews,* 68(2):234–262, 2004.
- Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), **Gram-positive Bacteria Other Than Actinomycetes.** Williams & Williams, Baltimore, MD, 1986.
- Hong, H.A.; Fakhry, S.; Baccigalupi, L.; Ricca, E.; Cutting, S.M. **Defining the natural habitat of *Bacillus* spore formers.** *Research in Microbiology* v.160, p. 375-379, 2009.
- Hutchison, E.A; Miller, D.A; Angert, E.R. **Sporulation in bacteria: beyond the standard model.** *Microbiol Spectrum.* v. 2, n.5, TBS-0013-2012, 2014.
- Hyder, S. L.; and Streitfeld, M. M. **Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage.** *J. Infect. Dis.* v.138, p.281–286, 1978.
- Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. **Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.** *Microbes Infect.* v.2, n.2, p.189-98, 2000.
- Jiménez, G.; Urdiain, M.; Cifuentes, A.; López-lópez, A.; Blanch, A.R.; Tamames, J.; Kämpfer, P.; Kolstø, A.B.; Ramón, D.; Martínez, J.F.; Codoñer, F.M.; Rosselló-Móra, R. **Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations.** *Systematic and Applied Microbiology,* v.36, n.6, p.383-391, 2013.
- Johler, S., Kalbhenn, E.M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R. and Ehling-Schulz, M. **Enterotoxin Production of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Biopesticides, Foods, and Outbreaks.** *Front. Microbiol.* v.9, p.1915, 2018.
- Johnson, C. M.; Grossman, A. D. **Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work.** *Annu. Rev. Genet.* v. 49, p.577–601, 2015.
- Jung, M.-Y.; Paek, W.K.; Park, I.-S.; Han, J.-R.; Sin, Y., Paek, J., Rhee, M.-S.; Kim, H.; Song, H.S.; Chang, Y.-H. ***Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea.** *The Journal of Microbiology,* v.48, n.6, p.867-871, 2010.
- Kakagianni, M. **Mapping the risk of evaporated milk spoilage in the Mediterranean region based on the effect of temperature conditions on *Geobacillus stearothermophilus* growth.** *Food Res Int.* v.111, p.104-110, 2018.
- Kamar, R.; Gohar, M.; Jéhanno, I.; Réjasse, A.; Kallassy, M.; Lereclus, D.; Sanchis, V.; Ramarao, N. **Pathogenic potential of *B. cereus* strains as revealed by phenotypic analysis.** *J. Clin. Microbiol.* v.51, p.320–323, 2013.
- Kramer J.M. e Gilbert R.J. ***Bacillus cereus* and other *Bacillus* species.** *Foodborne Bacterial Pathogens* (Doyle MP, ed), pp. 21–70, 1989.
- Kolsto, A.-B., Tourasse, N.J., Okstad, O.A. **What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?** *Annual reviews microbiology,* n. 63, p. 451-476, 2009.

- Koski, L.B., Golding, G.B. **The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor.** *J Mol Evol.* v.52, n.6, p.540-2, 2001.
- Kotiranta A.; Lounatmaa K.; Haapasalo M. **Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.** *Microbes Infect.* v.2, p.189–198, 2000.
- Kyndt, T.; Quispe, D.; Zhai, H.; Jarret, R.; Ghislain, M.; Liu, Q.; Gheysen, G.; Kreuze, J.F. **The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop.** *Proc. Natl Acad. Sci.* v.112, n.18, p.5844-5849, 2015.
- Kwak, M.K.; Liu, R.; Kwon, J.O.; Kim, M.K.; Kim, A.H.J.; Kang, S.O. **Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit proliferation of the Influenza A virus.** *J. Microbiol.* 51, 836–843, 2013.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds), **Nucleic acid techniques in bacterial systematic**, Wiley, New York. P.115-175, 1991.
- Larsen H.D.; Jørgensen, K. **Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products.** *Int J Food Microbiol.* v. 46, p.173–176, 1999.
- Lawrence, J.G., Ochman, H. **Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange.** *J Mol Evol.* v.44, n.4, p.383-97, 1997.
- Lechner, S. Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S. ***Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group.** *Int J Syst Bacteriol.* v. 48, 1373–1382 1998.
- Lee, D.Y.; Seo, Y.S.; Rayamajhi, N.; Kang, M.L.; Lee, S.I.; Yoo, H.S. **Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces.** *J. Microbiol.* 47, 663–672, 2009.
- Liaqat, I., Saleem, Q., Tahir, H.M., Arshad, M. Arshad, N. **Identification of virulence factors in contact lens associated bacteria: A physiological approach.** *Contact lens and anterior eye*, 2018.
- Liu, L; Liu, Y; Shin, H.D; Chen, R.R; Wang, N.S; Li, J; Du, G.G.; Jian, C. **Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology.** *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6113 – 6127, 2013.
- Luecking, G.; Stoeckel, M.; Atamer, Z.; Hinrichs, J.; Ehling-Schulz, M. **Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage.** *Int J Food Microbiol.* v.166, p.270–9, 2013.
- Logan, N. A.; de Vos, P. (EDS.). **Endospore-Forming Soil Bacteria.** *Springer*, 1^a. Ed, 2011.
- Lund, T., De Buyser, M.-L. e Granum, P. E. **A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis.** *Mol Microbio.* v.38, p.254–261, 2000.
- Madigan, M.T; Martinko, J.M; Parker, J. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Prentice Hall, 10^aed, 2004.
- Mahler, H.; Pasi, A.; Kramer, J.M.; Schulte, P.; Scoging, A.C.; Bar, W.; Krahenbuhl, S. **Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*.** *N Engl J Med* v.336, p.1142–1148, 1997.
- Mandic-Mulec, I.; Prosser, J.I. **Diversity of Endospore-forming Bacteria in Soil: Characterization and Driving Mechanisms.** *Endospore-Forming Soil Bacteria.* Springer, 1^a. Ed., 2011.
- Marston, C.K.; Ibrahim, H.; Lee, P.; Churchwell, G.; Gumke, M.; Stanek, D.; Gee, J.E.; Boyer, A.E.; Gallegos-Candela, M.; Barr, J.R.; Li, H.; Boulay, D.; Cronin, L.; Quinn, C.P.; Hoffmaster, A.R. **Anthrax toxin-expressing *Bacillus cereus* isolated from an anthraxlike eschar.** *Plos ONE*, v.11, n.6, e0156987, 2016.

- Martins, P.H.R. **Ampliação, caracterização fenotípica e estruturação da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos nativas do solo do Distrito Federal**. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- Maughan H, Auwera G.V. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol.* 11(5):789-97, 2011.
- McKenney, P.T; Driks, A; Eichenberger, P. **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat**. *Nat Rev Microbiol.* v.11, n.1, p.33-44, 2013.
- Mikkola, R., Saris, N.E., Grigoriev, P.A., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S. **Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus***. *Eur J Biochem.* v.263, n.1, p.112-7, 1999.
- Miller, R.A., Jian, J., Beno, S.M., Wiedmann, M., Kovac, J. **Intraclade Variability in Toxin Production and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* Group Type Strains and Dairy-Associated Isolates**. *Appl Environ Microbiol.* v.84, n.6: e02479-17, 2018.
- Modi, S. R.; Lee, H. H.; Spina, C. S.; Collins, J. **Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome**. *Nature.* v.499, p.219–222, 2013.
- Mortimer, P.R. e McCann, G. **Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice**. *Lancet.* v.1, p.1043–1045, 1974.
- Nazina, T.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B. **Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans***. *Int J Syst Evol Microbiol.* v.51, p.433–446, 2001.
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.M., Ali-Vehmas, T., Seppala, A., Priha, O., Salkinoja-Salonen, M. **Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk**. *Veterinary Microbiology.* v.124p. 329–339, 2007.
- Nilegaonkar S.S., Zambare V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik S.S. **Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326**. *Bioresour Technol.* v.98, n.6, p.1238-45, 2007.
- Nguyen, M.T.; Götz, F. **Lipoproteins of Gram-positive bacteria: Key players in the immune response and virulence**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 891–903, 2016.
- Ogura, M.; Hashimoto, H.; Tanaka, T. **Med, a cell-surface localized protein regulating a competence transcription factor gene, comK, in *Bacillus subtilis***. *Biosci Biotechnol Biochem.* v.66, n.4, p.892-6, 2002.
- Orem, J. C. **Diversidades funcional e filogenética de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo isoladas de solo**. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- Osman, K.M.; Kappell, A.D.; Orabi, A.; Al-Maary, K.S.; Mubarak, A.S.; Dawoud, T.M.; Hemeg, H.A.; Moussa, I.M.I.; Hessain, A.M.; Yousef, H.M.Y.; Hristova, K.R. **Poultry and beef meat as potential seedbeds for antimicrobial resistant enterotoxigenic *Bacillus* species: a materializing epidemiological and potential severe health hazard**. *Scientific reports.* v.8, p.11600, 2018.
- Østensvik, Ø.; From, C.; Heidenreich, B.; O’Sullivan, K.; Granum, P.E. **Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the *B. cereus* and *B. subtilis* groups in Norwegian surface waters**. *J Appl Microbiol.* v.96, p.987–993, 2004.

- O'Sullivan, M.G.; Thornton, G.C.; O'Sullivan, G.C.; Collins, J.K. **Probiotic bacteria myth or reality?** Trends food Sci. Technol. v. 31, p. 309-314, 1992.
- Owusu-Kwarteng, J.; Wuni, A.; Akabanda, F.; Tano-Debrah, K.; Jespersen, L. **Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products.** BMC Microbiol. v.1, p.65, 2017.
- Paananen, A., Mikkola, R., Sareneva, T., Matikainen, S., Hess, M., Andersson, M., Julkunen, I., Salkinoja-Salonen, M.S., Timonen, T. **Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*.** Clin Exp Immunol. v.129, n.3, p.420-8, 2002.
- Park K.M.; Jeong M.; Park K.J.; Koo M. **Prevalence, Enterotoxin Genes, and Antibiotic Resistance of *Bacillus cereus* Isolated from Raw Vegetables in Korea.** *J. Food Protection.* v.81, n.10, p.1590-1597, 2018.
- Pedersen, P.B.; Bjørnvad, M.E.; Rasmussen, M.D.; Petersen, J.N. **Cytotoxic Potential of Industrial Strains of *Bacillus* spp.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 36, n.2, p.155-161, 2002.
- Phelps, R.J.; MCKillip, J.L. **Enterotoxin Production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group.** Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n.6, p. 3147-3151, 2002.
- Pignatelli, M., Moya, A., Tamames, J. **EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa.** Environ. Microbiol. Rep. v.1, p.191–197, 2009.
- Poptsova, M. **Testing phylogenetic methods to identify horizontal gene transfer.** Methods Mol. Biol. v. 532, p.227–40, 2009.
- Postollec, F.; Mathot, A-G.; Bernard, M.; Divanac'h, M-L.; Pavan, S.; Sohier, D. **Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes.** Int J Food Microbiol. v.158, p.1–8, 2012.
- Ramarao, N., Sanchis, V. **The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*: A Review.** Toxins. v.5, p.1119-1139, 2013.
- Rasko, D.A.; Rosovitz, M.J.; Økstad, O.A.; Fouts, D.E.; Jiang, L.; Cer, R.Z.; Kolstø, A.B.; Gill, S.R.; Ravel, J. **Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1.** J Bacteriol. v.189, p.52–64, 2007.
- Ravenhall, M., Škunca, N., Lassalle, F., Dessimoz, C. **Inferring horizontal gene transfer.** PLoS Comput Biol. v.11, n.5, p.e100409, 2015.
- Redmond, C; Baillie, L.W; Hibbs, S; Moir, A.J. and Moir, A. **Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*.** Microbiology 150, 355–363, 2004.
- Reva, O. N.; Sorokulova, I. B.; Smirnov, V.V. **Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype.** *Int J Syst Evol Microbiol*, n. 51, p. 1361-1371, 2001.
- Rojas-Pinzon, P.A., Dussán, J. **Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*.** World J Microbiol Biotechnol. v.33, n.18, 2017.
- Rowan, N.J.; Deans, K.; Anderson, J.G.; Gemmell, C.G.; Hunter, I.S.; Chaithong, T. **Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae.** Applied and Environmental Microbiology. v. 67, n.9, p. 3873–3881, 2001.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R. **Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless-steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer.** J Food Prot. v.68, p.2614–2622, 2005.

- Salkinoja-Salonen, M.S.; Vuorio, R.; Andersson, M.A.; Kampfer, P.; Andersson, M.C.; Honkanen-Buzalski, T. Scoging, A.C. **Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning**. Applied and Environmental Microbiology. v.65, n.10, p. 4637–4645, 1999.
- Satomi, M., La Duc, M.T., Venkateswaran, K. ***Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces**. Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology v.56, p.1735–1740, 2006.
- Scarff, J.M.; Raynor, M.J.; Seldina, Y.I.; Ventura, C.L.; Koehler, T.M.; O'Brien, A.D. **The roles of AtxA orthologs in virulence of anthrax-like *B. cereus* G9241**. Molecular Microbiology, v.102, n.4, p.545-561, 2016.
- Schaefer, G., Campbell, W., Jenks, J., Beesley, C., Katsivas, T., Hoffmaster, A., Mehta, S.R., Reed, S. **Persistent *Bacillus cereus* Bacteremia in 3 Persons Who Inject Drugs, San Diego, California, USA**. Emerg Infect Dis. v.22, n.9, p.1621-3, 2016.
- Scott, S.A.; Brooks, J.D.; Rakonjac, J.; Walker, K.M.R.; Flint, S.H. **The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder**. Int J Dairy Technol. v.60, p.109–17, 2007.
- Setlow P. **Spore germination**. Curr Opin Microbiol. v.6, p.550–556, 2003.
- Shinagawa, K.; Konuma, H.; Sekita, H.; Sugii, S. **Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus***. FEMS Microbiol Lett. v.130, p.87–90, 1995.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. **Status of the Microbial Census**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 68, n.4, p.686–691, 2004.
- Sieber, S.A., Marahiel, M.A. **Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics**. Chem Ver. v.105, n.2, p715-38, 2005.
- Singh D, Sharma A, Saini GK. **Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region**. Biotech. v.3, n.3, p.205–212, 2013.
- Slamti, L.; Lereclus, D. **A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group**. EMBO J. v.21, p.4550–4559, 2002.
- Sonenshein, A.L. **CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria**. Curr Opin Microbiol. v.8, n.2, p.203-7, 2005.
- Soni, A.; Oey, I.; Silcock, P.; Bremer, P. ***Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. v. 15. 2016.
- Soucy, S.M.; Huang, J.; Gogarten, J.P. **Horizontal gene transfer: building the web of life**. Nature reviews. v.16, p.472-482, 2015.
- Swerdlow, B.M; Setlow, B. & Setlow, P. **Levels of H⁺ and Other Mono-Valent Cations in Dormant and Germinating Spores of *Bacillus megaterium***. Journal of Bacteriology. v.148, n.1, p.20-29, 1981.
- Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J.F., Oremland, R.S. ***Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic**. Arch. Microbiol. 171, 19–30, 1998.
- Tai, S.K.; Lin, H.P.P.; Kuo, J.; Liu, J.K. **Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater**. Extremophiles. v.8, p. 345–9, 2004.
- Tatum, E. L.; Lederberg, J. **Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli***. J. Bacteriol. v.53, p.673–684, 1947.

- Taubel, M., Kampfer, P., Buczolits, S., Lubitz, W., Busse, H.J. **Bacillus barbaricus sp. nov., isolated from an experimental wall painting.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.53, p.725–730, 2003.
- Te Giffel, M.C.; Beumer, R.R.; Granum, P.E.; Rombouts, F.M. **Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in The Netherlands.** *Int J Food Microbiol.* v.34, p.307–318, 1997.
- Thorsen, L.; Hansen, B.M.; Nielsen, K.F.; Hendriksen, N.B.; Phipps, R.K.; Budde1, B.B. **Characterization of Emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a New Cereulide-Producing Bacterium.** *Applied and Environmental Microbiology.* v.72, n.7, p. 5118–5121, 2006.
- Tusgul, S.; Prod'hom, G.; Senn, L.; Meuli, R.; Bochud, P.-Y.; Giulieri, B.S.G. ***Bacillus cereus* bacteraemia: A comparasion between haematological and non-haemotological patientes.** *New Microbes and New Infections*, v.15, p.65-71, 2017.
- Varga, M.; Kuntova, L.; Pantucek, R.; Maslanova, I.; Ruzickova, V.; Doskar, J. **Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone.** *FEMS Microbiol. Lett.* v.332, p.146–152, 2012.
- Van der Auwera G.A., Timmerly, S., Hoton, F., Mahillon, J. **Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs.** *Int J Food Microbiol.* v.113, n.2, p.164-72, 2007.
- von Wintersdorff, C. J.; Penders, J.; Stobberingh, E. E.; Lashof, A. M.; Hoebe, C. J.; Savelkoul, P. H.; et al. **High rates of antimicrobial drug resistance gene acquisition after international travel, the Netherlands.** *Emerging Infect. Dis.* v.20, p.649–657, 2014.
- Wei, X.; Xin, D.; Xin, Y.; Zhang, H.; Wang, T.; Zhang, J. ***Bacillus depressus* sp. nov., isolated from soil of a sunflower field.** *Antonie Van Leeuwenhoek.* v.109, n.1, p.13-20, 2015.
- Wiegand, S.; Rabausch, U.; Chow, J.; Daniel, R.; Streit, W.R.; Liesegang, H. **Complete genome sequence of *Geobacillus* sp. strain GHH01, a thermophilic lipase-secreting bacterium.** *Genome Announc.* v.1, n.2, e0009213 2013.
- Wong, H.C.; Chang, M.H.; Fan, J.Y. **Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products.** *Appl Environ Microbiol.* v.54, p.699–702, 1988.
- Wood, S.L.; Waites, W. **Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg.** *Food Microbiol.* v.5, p.103–7, 1988.
- Yokoyama, K., Ito, M., Agata, N., Isobe, M., Shibayama, K., Horii, T., Ohta, M. **Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* v.24, n.1, p.115-20, 1999.
- Zeigler, D.R., Perkins, J.B. The genus *Bacillus*. In: Goldman, E., Green, L.H. (Eds.), **Practical Handbook of Microbiology.** CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.
- Zinder, N.D.; Lederberg, J. **Genetic exchange in *Salmonella*.** *J Bacteriol.* v.64, n.5, p.679-99, 1952.
- Zhang, X.; Jin, T.; Deng, L.; Wang, C.; Zhang, Y.; Chena, X. **Stress-induced, highly efficient, donor cell-dependent cell-to-cell natural transformation in *Bacillus subtilis*.** *Journal of Bacteriology*, 2000: e00267-18, 2018.