

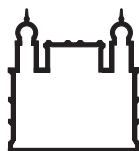
**Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Fisiologia Bacteriana**

**COLETÂNEA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS E METODOLOGIAS
EMPREGADAS PARA O ESTUDO DE *Bacillus* E GÊNEROS
ESPORULADOS AERÓBIOS CORRELATOS**

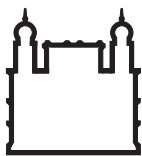
AUTORES

Leon Rabinovitch
Edmar Justo de Oliveira

2015



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Laboratório de Fisiologia Bacteriana

COLETÂNEA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS E METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA O ESTUDO DE *Bacillus* E GÊNEROS ESPORULADOS AERÓBIOS CORRELATOS

Laboratório de Fisiologia Bacteriana – LFB

(Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos – CCGB e Laboratório de Referência Nacional para Carbúnculo – LARENAC)

Laboratório de Fisiologia Bacteriana - LFB

Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos - CCGB

Laboratório de Referência Nacional para Carbúnculo - LARENAC

Tels: 2562-1640/2562-1637/2562-1639

Pavilhão Rocha Lima, 3º andar, salas 300-308-310-312

Av. Brasil, 4365, Manguinhos

Rio de Janeiro – RJ

CEP: 21040-900

e-mail: ccgb@fiocruz.br

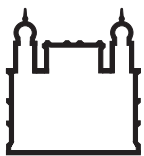
Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Col683 Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos / Autores: Leon Rabinovitch e Edmar Justo de Oliveira. – 1. Ed. – Rio de Janeiro : Montenegro Comunicação, 2015. 160p. ; 21x28cm.

Inclui bibliografia.
ISBN 978-85-67506-04-3 (broch.)

1. Bacteriologia.
I. Rabinovitch, Leon. II. Oliveira, Edmar Justo.

CDD 610.8



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Laboratório de Fisiologia Bacteriana

COLETÂNEA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS E METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA O ESTUDO DE *Bacillus* E GÊNEROS ESPORULADOS AERÓBIOS CORRELATOS

O Laboratório de Fisiologia Bacteriana, LFB, do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz é integrado por setores de pesquisa, ensino e desenvolvimento tecnológico, tendo na sua estrutura o Laboratório de Referência Nacional para Carbúnculo, LARENAC e Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos, CCGB, filiada à Federação Mundial de Coleções de Culturas, WFCC.

AUTOR-ORGANIZADOR:

Leon Rabinovitch, Farmacêutico-Químico, PhD

AUTOR ASSOCIADO

Edmar Justo de Oliveira, Químico, MSc

COLABORADORES:

Adriana Marcos Vivoni, Microbiologista, PhD

Claude André Solari, Médico, PhD

Claudio Simões de Mattos, Biomédico, MSc

Jeane Quintanilha Chaves, Farmacêutica, PhD

Josiane Teixeira de Brito, Bióloga

Sônia Ermelinda Alves da Silva, Bióloga, MSc

Vera Cristina Pessoa de Lima, Bióloga

Primeira Edição - 2015

Imagens de capa: *Bacillus*, célula vegetativa e esporângios com corpo paraesporal.

SUMÁRIO

COLETÂNEA DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS E METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA O ESTUDO DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS ESPORULADOS AERÓBIOS CORRELATOS	
PREFÁCIO	11
INTRODUÇÃO	12
NOÇÕES E CONCEITOS BÁSICOS	13
CONCEITOS DE ESPÉCIE EM CÉLULAS PROCARIÓTICAS COMO AS BACTÉRIAS	14
BACTÉRIAS COMO SISTEMAS VIVOS	15
BASTONETES E COCOS PRODUTORES DE ENDÓSPOROS	16
TABELA 1: ALGUNS CARACTERES DE BACTÉRIAS FORMADORAS DE ENDÓSPOROS E GÊNEROS CORRELATOS	18
MORFOLOGIA CELULAR	19
PAREDE CELULAR DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS	21
TABELA 2: ALGUNS TIPOS DE MUREÍNA ENCONTRADOS EM <i>Bacillus</i> E EX- <i>Bacillus</i> HOJE PERTENCENTES A OUTROS GÊNEROS	22
CÁPSULAS	24
DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELACIONADOS ¹	25
TABELA 3: CITOMORFOLOGIA DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS. POSIÇÃO DE ESPOROS NO ESPORÂNGIO E DIMENSÕES	26
TABELA 3A: CITOMORFOLOGIA DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS. POSIÇÃO DE ESPOROS NO ESPORÂNGIO E DIMENSÕES	27
TABELA 3B: CITOMORFOLOGIA DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS. POSIÇÃO DE ESPOROS NO ESPORÂNGIO E DIMENSÕES	28
TABELA 4: EXEMPLO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS PARA A SEPARAÇÃO DOS GÊNEROS <i>Bacillus</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> e <i>Virgibacillus</i>	30
PROCEDIMENTOS MÍNIMOS PADRONIZADOS PARA A DESCRIÇÃO DE NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO <i>Bacillus</i> E BACTÉRIAS RELACIONADAS	32
1. EXIGÊNCIA GERAL - PROCEDIMENTOS	32
2. CARACTERES MORFOLÓGICOS E TINTORIAIS	33
3. CARACTERES COLONIAIS	33

4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS	33
5. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS AVALIADAS ATRAVÉS DAS SEGUINTE PROVAS ...	34
6. CARACTERES QUIMIOTAXONÔMICAS	35
7. ESTUDOS DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS	35
CAPÍTULO 1: MEIOS PARA CULTIVO E ISOLAMENTO	36
1.1. CALDO NUTRIENTE – CN	36
1.2. ÁGAR NUTRIENTE – AN	36
1.3. ÁGAR NUTRIENTE – ANCTC	36
1.4. CALDO-J	37
1.5. ÁGAR-J	37
1.6. ÁGAR-J DIFÁSICO	37
1.7. ÁGAR EXTRATO DE SOLO – AES	38
1.8. EXTRATO DE SOLO	38
1.9. MEIO SABOURAUD DEXTROSE. VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO EM PH 5,7	39
1.10. MEIO CALDO GLICOSADO – VP E PARA O TESTE DE VOGES-PROSKAUER	40
1.11. MEIO NYSM	42
1.12. MEIO NYSM – SÓLIDO	42
1.13. MEIO DE CIANETO DE POTÁSSIO	42
1.14. MEIO DE HIPURATO	43
1.15. VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE CALDO AZIDA-SÓDICA	44
1.16. MEIO VRM PARA CONTAGEM DE <i>Bacillus cereus</i>	45
1.17. CALDO MBS	46
1.18. ÁGAR MBS	46
1.19. MEIO ANM LÍQUIDO	47
1.20. MEIO PARA <i>Bacillus cereus</i> BCM	47
1.21. ÁGAR ANAERÓBICO	48
1.22. ÁGAR MUELLER HINTON	49
1.23. ÁGAR PLATE COUNT (PCA)	49
CAPÍTULO 2: PROVAS BIOQUÍMICAS	50
2.1. MEIO DE NITRATO	50

2.2. MEIO DE FENILALANINA	50
2.3. MEIO DE GELATINA	51
2.4. MEIO PARA CARBOIDRATOS	52
2.5. ÁGAR ESCULINA	53
2.6. REAÇÃO DA GEMA DE OVO	53
2.7. TESTE DA OXIDASE	54
2.8. PROVA SIMULTÂNEA DA AMILÓLISE E PROTEÓLISE	55
2.9. MEIOS DE CULTURA CITADOS NA LITERATURA DESTINADOS À CONTAGEM BACTERIANA E VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE LIPÓLISE	55
CAPITULO 3: PROVAS FISIOLÓGICAS	58
TABELA 5: FAIXAS DE TEMPERATURAS PARA A DETERMINAÇÃO ÓTIMA DE CRESCIMENTO	58
3.1 VERIFICAÇÃO DE CRESCIMENTO EM ÁGAR ANAERÓBICO	59
3.2. VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	59
3.3. VERIFICAÇÃO DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO	60
CAPITULO 4: PROVAS CITOMORFOLÓGICAS	61
4.1. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM MODIFICADO	61
4.2. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ESPOROS	63
4.3. COLORAÇÃO PARA OBSERVAÇÃO DA FORMA E ARRANJO DE FLAGELOS	63
4.4. COLORAÇÃO DE CÁPSULA BACTERIANA	65
ANEXOS	67
ANEXO 1 - ÁGUA REAGENTE E SOLVENTE NO LABORATÓRIO DE PESQUISA MICROBIOLÓGICA	67
TABELA 6: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO	70
ANEXO 2 –TESTE PARA VERIFICAÇÃO DE TOLERÂNCIA À PRESENÇA DE FENOL, ETANOL, XILOL E CRESÓIS	73
ANEXO 3 - VERIFICAÇÃO DE CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE METAIS	74
ANEXO 4 - TESTE DE TOLERÂNCIA AOS INSETICIDAS	75
ANEXO 5 - PROCEDIMENTOS PARA ISOLAMENTO DE <i>Bacillus</i> A PARTIR DE SOLO	76
ANEXO 6 - DETERMINAÇÃO DA MORFOLOGIA DE ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i>	77

ANEXO 7 - MEIO DE CULTURA PARA A OBTENÇÃO DE BIOMASSAS DE <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS	78
ANEXO 8 - COMPONENTES INICIAIS PARA FORMULAÇÃO DE PRÓTIPO DE PRODUTO E ENTRADAS PARA A PRODUÇÃO DE 3 LITROS DE PRODUTO	81
ANEXO 9 - FABRICAÇÃO DO “FERMENTO LÁTICO” <i>Extra Programa</i>	82
ANEXO 10 - ISOLAMENTO DE BASTONETES ESPORULADOS AERÓBIOS OU AERÓBIOS FACULTATIVOS GRAM-POSITIVOS DE MINÉRIOS	85
ANEXO 11 - SOLUÇÕES PADRÕES-PRIMÁRIAS PARA MEDIDAS ELETROMÉTRICAS DE pH (POTENCIÔMETRO DE ELETRODO DE KCL) E USO DO POTENCIÔMETRO	86
ANEXO 12 - SOLUÇÃO DESINFETANTE DE SEGURANÇA	91
ANEXO 13 - SALINA TAMPONADA- SATAMP	92
ANEXO 14 - ROTEIRO PARA TRATAMENTO ANTISSEPTICO DE SUPERFÍCIE EXTERNA DE OVOS DE DIPTEROS	93
ANEXO 15 - CURVAS DE INATIVAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Bacillus</i> PRESERVADOS E CONSERVADOS CONFORME MODELO CCGB	94
ANEXO 16 - SUSPENSÃO PADRONIZADA DE ESPOROS BACTERIANOS	96
ANEXO 17 - PRESERVAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE LINHAGENS DE ESPORULADOS AERÓBIOS GRAM-POSITIVOS A -196°C (NITROGÊNIO LÍQUIDO) COM GERMINAÇÃO E PREPARO DE INÓCULOS PARA USO CONSTANTE (LFB/IOC/FIOCRUZ)	97
ANEXO 18 - ROTEIRO PARA TRATAMENTO ANTISSEPTICO DE SUPERFÍCIE EXTERNA DE COPRÓLITO	98
ANEXO 19 - PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPORULADAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO-MET E DE VARREDURA-MEV	99
ANEXO 20 - PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO DE ESPOROS	101
ANEXO 21 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA PADRONIZADA E FORMULADA DE <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 2362	102
ANEXO 22 - METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS LIOFILIZADAS IMPREGNADAS EM PAPEL DE FILTRO	104
ANEXO 23 - METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS LIOFILIZADAS E NÃO LIOFILIZADAS	105
ANEXO 24 - DETERMINAÇÃO DE PESO SECO – SUSPENSÕES MICROBIANAS	106
ANEXO 25 - DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ E CÁLCULO DAS UNIDADES TÓXICAS INTERNACIONAIS-UTI	107

TABELA 7: PROTOCOLO EXPERIMENTAL I - <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i> – PÓ PADRÃO	
LARVAS L ₂ /L ₃ - <i>Culex quinquefasciatus</i>	109
TABELA 8: PROTOCOLO EXPERIMENTAL II - <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar <i>israelensis</i> – PÓ PADRÃO	
LARVAS L ₂ /L ₃ - <i>Culex quinquefasciatus</i>	110
ANEXO 26 - PRESERVAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE LINHAGENS DE ESPORULADOS	
AERÓBIOS GRAM-POSITIVOS A -70°C COM GERMINAÇÃO E PREPARO DE	
INÓCULOS PARA USO CONSTANTE (LFB/IOC/FIOCRUZ)	111
ANEXO 27 - CONTAGEM NA CÂMARA DE PETROFF-HAUSSER	112
ANEXO 28 - METODOLOGIA PARA APLICAÇÃO DO TESTE	
API 50 CH® (BIOMÉRIEUX) PARA <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS	113
ANEXO 29 - SELEÇÃO DE LINHAGENS NATURAIS DE <i>Bacillus</i>	
ENTOMOTÓXICOS ATRAVÉS DE PASSAGENS POR LARVAS DE MOSQUITO VETOR	114
ANEXO 30 - MÉTODO RÁPIDO E EFICAZ PARA CONTAGEM	
DE ESPOROS NAS BIOMASSAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	116
ANEXO 31 - MORFOLOGIAS E DIFERENCIAÇÕES ENTRE ESPOROS NO GÊNERO	
<i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS	117
ANEXO 32 - MICROMETRIA	120
ANEXO 33 - ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i>, ESPÉCIES NOVAS E ESPÉCIES	
CORRELATAS EXISTENTES E RECLASSIFICAÇÃO SEGUNDO	
ESTUDOS FILOGENÉTICOS INTRA-ESPECÍFICOS	124
ANEXO 34 - MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS À <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS ...	144
1. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE CRISTAIS DE PROTOXINAS EM GEL DE	
POLIACRI LAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)	144
TABELA 9 - DEMONSTRAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE CADA GEL	146
2. EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>B.cereus</i> SENSO LATO ATRAVÉS DE LISE TÉRMICA	149
3 - TIPAGEM DE CEPAS DE <i>B.cereus</i> SENSO LATO ATRAVÉS DE REP-PCR	150
4 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES CODIFICADORES DE FATORES	
DE VIRULÊNCIA, HEMOLISINAS (HLY II E HLY III), FOSFOLIPASES (PIPLC)	
E CEREOLISINAS A (PCPL) E B (SPH)	151
ANEXO 35 - MÉTODOS FENOTÍPICOS APLICADOS À <i>Bacillus</i> E GÊNEROS CORRELATOS	152
ANEXO 36 - TIPOS MORFOLÓGICOS DE ESPOROS, ESPORÂNGIOS E	
CADEIAS DE CÉLULAS	153
ANEXO 37 - MEDIÇÃO DE CÉLULAS (COMPRIMENTO E LARGURA)	154

ANEXO 38 - PROTOCOLOS DE ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	
CONTRA BACTÉRIAS DE INTERESSE DAS ÁREAS DE SAÚDE E AMBIENTE	155
TABELA 10: CEPAS DE INTERESSE NAS ÁREAS DE SAÚDE HUMANA E ANIMAL	156
ANEXO 39 - SÚMULA DE ROTA PARA IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO	
CELULAR E DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE BASTÃO ESPORULADO,	
GRAM-POSITIVO, AERÓBIO OU AERÓBIO FACULTATIVO	159

PREFÁCIO

Utilizando linguagem simples e, ao mesmo tempo precisa, a **Coletânea de Procedimentos Técnicos e Metodologias Empregadas para o Estudo de *Bacillus* e Gêneros Esporulados Aeróbios Correlatos** é um manual imprescindível em todos os Laboratórios envolvidos em experimentação e diagnóstico de bactérias, mais especificamente aquelas dos gêneros *Bacillus* e correlatos.

Nesta Coletânea, Leon Rabinovitch e colaboradores descrevem inicialmente uma série de conceitos que permitirão ao leitor adquirir noções básicas de bacteriologia, particularmente relativas a *Bacillus* e gêneros correlatos. Assim, deslizando desde a morfologia até a bioquímica e biologia celular e molecular, o leitor gradualmente se apropria do conhecimento necessário para a realização consciente de quaisquer manipulações de cultivo, sejam elas para fins de pesquisa biomédica ou para diagnóstico. Destacam-se nesta parte da Coletânea os procedimentos mínimos para descrição de novas espécies do mesmo gênero.

Uma vez estabelecidas as básicas teóricas essenciais, a coletânea descreve de forma detalhada um série de meios de cultivo. Tal descrição, para além de ser um importante catálogo de procedimentos em vários exemplos, faz ainda uma análise crítica de situações-problema que podem surgir e, de uma maneira geral, indicações de uso de tais ou quais meios de cultivo.

Continuando o fluxo natural de aquisição do conhecimento, o leitor é então exposto às provas fisiológicas e métodos de coloração, visando à caracterização destas bactérias.

Em seguida, uma extensa série de anexos descreve procedimentos mais específicos, como por exemplo o crescimento bacteriano em presença de metais, testes de tolerância a inseticidas, entre outros. Nesta mesma série, o leitor adentra um outro mundo que é o da produção em escala, a partir de espécies isoladas adequadamente, além de procedimentos e conservação de linhagens esporuladas, incluindo criopreservação de esporos.

Por fim, a **Coletânea** provê uma extensa lista de espécies do gênero *Bacillus*, contendo os respectivos dados iniciais sobre o isolamento de cada espécie e que, seguramente, serão úteis no dia a dia do laboratório.

Para um leitor que não trabalha em cultivos bacterianos, a **Coletânea** traduz-se como um texto simples, objetivo e, ao mesmo tempo, completo, que nos permite adquirir a noção clara sobre a importância da própria existência do livro.

Por outro lado, temos certeza absoluta que a **Coletânea de Procedimentos Técnicos e Metodologias Empregadas para o Estudo de *Bacillus* e Gêneros Esporulados Aeróbios Correlatos** se tornará um livro de bancada em todos os Laboratórios que se dedicam ao tema, caracterizando-se ainda como leitura obrigatória relativa a todos os processos de gestão pela qualidade de Laboratórios que trabalham com fisiologia e cultivo de bactérias.

Wilson Savino

Pesquisador Titular e Diretor do Instituto Oswaldo Cruz,
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro
Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências

INTRODUÇÃO

No grupo das bactérias aeróbias ou aeróbias facultativas esporuladas o Gênero *Bacillus* e gêneros geneticamente próximos ocupam um lugar expressivo em virtude de apresentarem muitas espécies úteis ao homem. Poucas espécies são patogênicas, e as demais despontam, preferencialmente, como microrganismos de importância industrial, pois geram produtos que são comercializados. Diferentes enzimas, proteínas, antibióticos, inseticidas bacterianos e outros compostos orgânicos são produzidos em escala industrial graças a esses microrganismos. Por este motivo, essas bactérias são muito estudadas sob os mais variados aspectos. O isolamento de novas estirpes e a identificação, preservação e conservação das mesmas ocupam lugar de destaque no campo da pesquisa e desenvolvimento de produtos biológicos.

A presente coletânea de meios de cultura e procedimentos laboratoriais traduz a preocupação do Laboratório de Fisiologia Bacteriana – LFB, do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz – Ministério da Saúde, em preservar a sua experiência e divulgar os caminhos que levam os seus pesquisadores e técnicos a conhecer as diferentes características das espécies de *Bacillus* e de gêneros correlatos com as quais lidam, auxiliando os estudos taxonômicos e pesquisas.

Na elaboração deste conjunto de informações metodológicas básicas, considerou-se a importância da expressão fenotípica através da submissão das bactérias a condições de cultivo modelares, bem como procedimentos técnicos, para, deste modo, permitir a reprodução de resultados e sua comparação com aqueles de outros autores publicados em diferentes tempos.

Convém ressaltar que as características fenotípicas clássicas tais como morfologia e citologia, sorologia, bioquímica e fisiologia celulares são de importância para, em conjunção com caracteres quimiotaxonômicos e estudos dos ácidos nucléicos e aliados às características genotípicas, permitir uma melhor discriminação dentro dos grupos bacterianos e, melhor ainda, entre indivíduos que integram um gênero ou uma espécie.

O estudo dessas características e a padronização dos métodos e técnicas vêm sendo propostos pelo Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática, Sub-Comitê de Taxonomia do Gênero *Bacillus*, com vistas à descrição de espécies novas, inclusive para os organismos próximos aos *Bacillus*. Uma listagem de procedimentos e características mínimas sugeridas pelo Sub-Comitê está também apresentada aqui, muito embora outros procedimentos e meios de cultura em uso figurem da mesma forma neste conjunto de excertos seletos.

Leon Rabinovitch

Autor

NOÇÕES E CONCEITOS BÁSICOS

Microorganismos, Habitats e Associações¹

Na natureza, os grupos de células microscópicas, incluindo as procarióticas das bactérias, estão associados entre si formando populações. O local onde grupos de microrganismos vivem tem a denominação de habitat. Neste, podem ser encontrados ambientes preferenciais de espécies de bactérias denominados “nichos ecológicos”. Os habitats podem estar localizados em locais de fácil ou de difícil acesso para o homem – por vezes até impossível. Outras vezes, as populações implantam habitats em seres vivos, animais e vegetais. Como as populações interagem entre si, que é quando diferentes reações químicas ocorrem, a consequência é a predominância de grupos que sucessivamente se alternam conforme as características naturais dos integrantes dessas populações e os nutrientes existentes.

O agrupamento desses seres também é conhecido por “comunidades microbianas”, compostas por diferentes células de movimentação livre ou, inversamente, constituindo biofilmes. Estes últimos expressam vida com suas diferentes reações químicas relacionadas à nutrição e ao metabolismo, modificam os locais e o meio ambiente, bem como os materiais onde os seres estão fixados; por sua vez, a associação desses seres vivos e suas relações com o meio ambiente onde se situam recebe a denominação de ecossistema.

Assim, bactérias integrantes de comunidades microbianas podem ser encontradas em diferentes habitats – vivos ou inanimados. E podem daí ser retiradas das misturas e cultivadas em laboratório, onde ainda podem ser preservadas e conservadas em condições de viabilidade (sem replicação celular), mas com individualidade específica, uma única espécie.

1. [Michael T. Madigan; John M. Martinko & Jack Parker “Microbiologia de Brock”, 2004. São Paulo: Prentice Hall].

CONCEITO DE ESPÉCIE EM CÉLULAS PROCARIÓTICAS COMO AS BACTÉRIAS²

Bactérias são células integrantes do grupo de procariotos filogeneticamente relacionados, e são distintas dos membros integrantes dos domínios *Archaea* e *Eukarya*. As bactérias são seres haploides e se reproduzem assexuadamente por mecanismo denominado de cissiparidade ou bipartição. Os microbiologistas, em particular os bacteriologistas, adotam hoje, até segunda ordem, a combinação de taxonomia (taxionomia) polifásica³ de modo a diferenciar espécies procarióticas com bases tanto genéticas quanto fenotípicas, estudando características da célula. Considerando as características genéticas até então conhecidas, os critérios da taxonomia polifásica adotam o sequenciamento do RNAr (ribossomal) e a hibridização genômica (hibridização DNA-DNA).

Um procarioto cuja sequência de RNAr 16S apresente mais de 3% de diferenças com relação às outras células do mesmo domínio (isto é, quando a similaridade de qualquer sequência comparada a outra dentro de um banco de dados é inferior a 97%) passa a ser considerado como nova espécie. Para tanto, a espécie bacteriana é examinada quanto às características que se conhece e se convencionou adotar, com abordagens que englobam a morfologia celular, colonial, suas propriedades tintoriais, dimensões da célula, metabolismo fisiológico, energético e bioquímico, de síntese, de excreção, enzimático, antigênico e até o emprego de métodos moleculares que revelam características genéticas (plasmídeos e genes específicos, sequenciamento de genes etc.).

2. [Michael T. Madigan; John M. Martinko & Jack Parker “Microbiologia de Brock”, 2004. São Paulo: Prentice Hall].

3. *Taxonomia* está ligada à classificação microbiana, é a ciência da classificação, que depende da identificação e da nomenclatura. Em bactérias a nomenclatura é sempre binária de modo a evidenciar um gênero e a espécie desse gênero. Dentro de espécies podem existir variedades, tipo ou sub-espécies que originam os conceitos de “cepa”, “estirpe” ou “linhagem” para mostrar diferenciações bioquímicas, fisiológicas e sorológicas dentro de uma mesma espécie (diferenciações intraespecíficas).

BACTÉRIAS COMO SISTEMAS VIVOS⁴

Todos os organismos celulares, incluindo bactérias, apresentam reações que expressam atividades de assimilação, degradação ou síntese de substâncias, inclusive utilizando essas atividades para aplicar na sua própria reprodução. Assim, bactérias apresentam metabolismo, que é expresso de modos diferentes. As células bacterianas são capazes de captar substâncias químicas do “meio ambiente”, normalmente por se encontrarem em solução aquosa. Os processos bioquímicos envolvidos na degradação de compostos orgânicos ou inorgânicos, em geral produzindo energia química, são conhecidos como catabolismo. De outro modo, no anabolismo ocorrem as sínteses, consumindo a energia anteriormente armazenada.

Aqui, a conservação de parte da energia química é feita por armazenamento em compostos, de modo que possam ser utilizados por ela mesma, e posteriormente excretando os produtos finais das reações não mais necessários. A energia é utilizada para novas sínteses que conduzem à reprodução, ou seja, são capazes de realizar reações bioquímicas em proveito da reprodução da espécie. Reação ocorrente, quer no anabolismo quer no catabolismo, geram substâncias diferentes que podem ajudar na classificação, colocando assim o microrganismo em grupos taxonômicos. Uma substância originária de metabolismo e excretada para o meio de cultivo poderá ser identificada através de métodos químicos ou físicos que podem ser específicos. Se forem reações da substância com reativos especiais, por vezes específicos, ela é chamada de prova bioquímica. É o que acontece quando se busca saber como uma célula utiliza açúcares de baixo e alto peso molecular, aminoácidos e sais inorgânicos, entre outros.

De modo inverso, se a faculdade de uma célula é de poder se multiplicar em meio de cultura cuja composição seja adversa ao desenvolvimento celular normal, essa propriedade é dita prova fisiológica. Tal denominação também é dada quando o microrganismo metaboliza sob condições ambientais críticas, normalmente impeditivas para alguns tipos de células. É o que acontece quando se procura verificar se um microrganismo é capaz de crescer em concentração elevada (hipertônica) de cloreto de sódio ou sacarose e em temperaturas inferiores ou superiores às ótimas para o seu crescimento.

Por vezes, as células microbianas passam por processos de diferenciação celular, pelos quais novas substâncias e estruturas são sintetizadas. A diferenciação celular frequentemente corresponde a uma etapa do ciclo de vida no qual esse indivíduo forma estruturas especializadas envolvidas na reprodução, dispersão (da espécie) e sobrevivência. Um exemplo de diferenciação celular é a produção de esporos a partir da célula vegetativa-mãe, fato que ocorre em grupos bacterianos, como por exemplo nos Gêneros *Bacillus* (bastonetes aeróbios ou aeróbios facultativos, Gram-positivos) e Gênero *Clostridium* (bastonetes anaeróbios, Gram-positivos).

4. [Michael T. Madigan; John M. Martinko & Jack Parker “Microbiologia de Brock”, 2004. São Paulo: Prentice Hall].

BASTONETES E COCOS PRODUTORES DE ENDÓSPOROS

Bactérias capazes de produzir endósporos e esporos, a maioria Gram-positivos em forma de bastões ou cocos, muitos dotados de mobilidade, constituem um grande grupo de procariotos que possuem a propriedade especial de diferenciação celular. A verificação de que alguns cocos seriam capazes de também produzir endósporos no citoplasma levou a que o Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática, volume 2, (Seção 13) 1986, incluisse os cocos juntamente com bastonetes em uma mesma Seção (Tabela 1). É o caso do gênero *Sporosarcina*, sobre o qual não se tinha ideia de que produzisse esporo. Assim, *Sarcina* foi inserida num contexto de morfologia em bastão composto por células de comprimentos e larguras variados. A despeito de células produzirem endósporos, um grande número de gêneros pode, em estádios avançados obtidos com longos períodos de cultivo, liberar seus esporos, que são chamados de esporos livres ou maduros (vide a Tabela 1, na qual várias características de morfologia, propriedades tintoriais, propriedades respiratórias, bioquímicas e fisiológicas são comparadas entre gêneros).

Se esses cultivos ocorrem em meio ambiente, os esporos maduros podem permanecer viáveis, depositados sob a superfície de micropartículas ou mesmo englobados por formações de materiais os mais diversos, podendo daí serem recuperados.

Endósporos podem ser confundidos com inclusões lipídicas ocorrentes no citoplasma. Todavia, em meios de cultura apropriados os endósporos perdem a refratibilidade e então a nova célula origina-se por germinação. Endósporos podem ter morfologias arredondadas ou esferóides, cilíndricas e elípticas, de tamanhos variados. Suas superfícies são em geral lisas. É sabido que endósporos produzem uma reação características do tipo $N-HNO_3$, mediante a qual “explodem” liberando o esporo. Contudo, célula em estágio de endósporo é melhor demonstrada quando o esporo, ainda no interior da célula, sobrevive ao aquecimento, o que não ocorre da mesma maneira com a célula vegetativa (não contendo esporo). Para tanto, temperaturas de, no mínimo, 70-80°C aplicadas por tempo de pelo menos 10 min são recomendadas, seguindo-se o cultivo em temperatura permissível e em meio de cultura suficientemente nutritivo. De outro modo, a propriedade de sobreviver em etanol a 95% por 45 min a 20°C também pode ser testada para diferenciação de lipídios intracelulares e endósporos. Os lipídios se solubilizam e a maioria dos esporos permanece viável.

Os endósporos se formam, sobretudo, em cultivos envelhecidos, o que ocorre quando se deixa as formas vegetativas permanecerem muitas horas em incubação em temperaturas permissíveis, por vezes, por muitos dias, como por exemplo 10 dias. Posteriormente a isso se pode abandonar a espera de endósporos.

De outro modo, a formação de endósporos pode ser impedida por condições desfavoráveis, por exemplo elevada concentração de açúcar. Linhagens de *Bacillus* podem requerer meios de cultivo que contenham suprimentos suficientes de íons Mn^{2+} . Por vezes, espécies desse gênero requerem suprimentos adicionais de Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Os *Clostridium* (anaeróbios) não efetuam a esporogênese se o meio de cultura não estiver “altamente” anaeróbico, ou se estiver excessivamente ácido.

As relações taxonômicas entre as bactérias formadoras de endósporos permanecem ainda desconhecidas. Há evidências a partir de trabalhos com rRNA que mostram que *Bacillus* e *Clostridium* pertencem a um grande ramo de procarioto, o qual encerra ainda outros gêneros como: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*,

Eubacterium, *Acetobacterium*, *Sarcina* e, provavelmente, os micoplasmas. *Bacillus* e *Clostridium* são células muito diversas do ponto de vista fenotípico, assim como genômico, como pode ser demonstrado pela amplitude das relações G+C. *Clostridium* em particular é representado por muitas ramificações de rRNA, uma das quais é relacionada com *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*.

Sporosarcina e *Planococcus* se relacionam filogeneticamente com *Bacillus* com base no rRNA-16S, enquanto que *Thermoactinomyces vulgaris* fica muito mais próximo de *Bacillus subtilis* do que de *Streptomyces* e organismos similares a este último gênero.

Existe, portanto, um cenário emergente que procura mostrar que os formadores de endósporos fazem parte de uma ramificação no grupo das bactérias bastante distinta, mas que também encerra gêneros que podem não produzir esporos. Todavia, como corolário, se alguns *Clostridium* não são capazes de formar esporos, talvez por não terem encontrado condições de cultivo apropriadas ou por defeitos genéticos, então os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* irão se subdividindo em vários gêneros novos, como vem ocorrendo nos últimos tempos.

Tabela 1: Alguns caracteres de bactérias formadoras de endósporos e gêneros correlatos

Características	Gêneros formadores de endósporos					Gêneros não formadores de endósporos ^a				
	<i>Bacillus</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Sporosarcina</i>	<i>Planococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Kuriia</i>		
Forma em bastonetes	+	+	+	+	-	-	+	-		
Diâmetro > 2,5µm	-	-	-	-	-	-	-	-		
Cocos em tétrades	-	-	-	-	+	c	-	-		
Produção de endósporos	+	+	+	+	+	-	-	-		
Motilidade	+	+	+	+	+	+	-	+		
Coloração de Gram (cultura jovem) ^d	+	+	+	-	+	+	+	+		
Aeróbio estrito	v	-	-	-	+	+	-	+		
Aeróbio facultativo ou microaerófilo	v	+	- ^b	-	-	-	+	-		
Anaeróbios estritos	-	-	+	+	-	-	-	-		
Fermentação homolática	v	+	-	-	-	-	v	-		
Redução de sulfato a sulfeto	-	-	-	+	-	-	-	-		
Catalase	+	-	-	-	+	+	-	+		
Oxidase	v	ND	-	ND	+	-	-	-		
Redução de nitrato a nitrito	v	-	v	ND	v	-	-	-		
Mol % G+C	32-69	38-40	24-54	37-50	40-42	39-52	32-53	36-38		

+: 90% ou mais de cepas positivas; -: 10% ou menos de cepas positivas; a: não inclui os gêneros *Thermoacidomyces* e *Pausteria*; b: raramente aerotolerante; c: 11-89% de cepas positivas; d: referência de até 10 horas após semeadura; v: Variável; ND: não determinado; Baseado em: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, Sect. 3. 1986. Peter H.A. Sneath. Editor, N.S. Mair, E. Sharpe Assoc. Ed., Williams e Wilkins, Baltimore.

MORFOLOGIA CELULAR

Bacillus (Cohn 1872) e gêneros correlatos são células em forma de bastões. As dimensões variam, e são chamados de bastões ou bastonetes. Muitas dessas células podem ser de bastões retos ou levemente encurvados, sendo essas características das espécies desses gêneros. As células podem ocorrer isoladamente ou formar pares ou mesmo cadeias, cujas extensões podem ser de muitas células como, por exemplo, de 20, 30 ou mais. Cada bastão pode apresentar seu extremo (pólo) arredondado, ou quase, formando extremidade em ângulo reto. Podem ser encontrados com dimensões de 0,5 x 1,2 μm ou em forma de grandes células com 2,5 x 10 μm . O citoplasma pode ser vacuolado ou se corar uniformemente sem vacuolos, podendo ainda, em certas espécies, apresentar inclusões de natureza protéica chamadas de corpos paraesporais ou cristais de proteínas cujas morfologias variam. A forma do endósporo e a figura da célula-mãe portadora do espora (esporângio) são características de espécies de *Bacillus* e de alguns gêneros correlacionados.

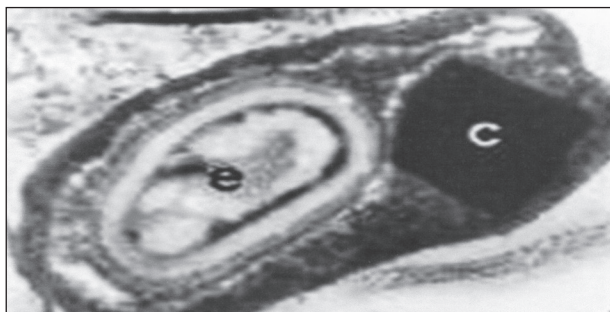


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão de *Bacillus thuringiensis*: endósporo (e) e corpo paraesporal (c)



Figura 2: Esporângio de *Bacillus* com seu endósporo(e)

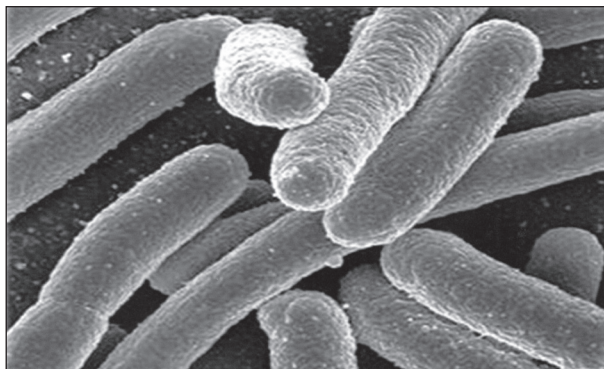


Figura 3: Células vegetativas de *Bacillus*

Figura 1. Revista: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 74, Ano XI, nº38 (2009/2010);

Figura 2. <http://tidepool.st.usm.edu/crswr/endospore.html>;

Figura 3.: <http://biologiamauricioeduardo.blogspot.com.br/2013/07/reino-monera.html>.

Os esporos são de origem endocitoplasmática e localizam-se no interior da célula-mãe, o esporângio. A forma desses esporos varia: podem ser cilíndricos, elipsoidais, ovais ou esféricos. Mas, cepas de certas espécies podem produzir seus esporos com morfologias semelhantes a de rins humanos ou a de bananas.

Os esporos são descritos quanto à forma, em função da predominância desta numa população que se encontra esporulada. Isso significa que quando se examina esporos ao microscópio com cerca de 1.500 aumentos, a morfologia será aquela que predominar ao serem examinadas 100 células.

A localização dos esporos no esporângio pode se dar na posição central, para-central, subterminal, terminal ou lateral e deve ser examinada ao microscópio com 1.500 aumentos, verificando-se também a posição predominante ao se examinar 100 células na condição de esporângios.

Ruth E. Gordon e seus colaboradores, em 1973, distribuíram suas estirpes de diferentes espécies de *Bacillus* em três grupos baseados na forma dos esporos e na condição do esporângio estar dilatado, ou não. No grupo 1, ficaram os esporângios predominantemente elipsoidais ou cilíndricos; no grupo 2, esporos elipsoidais que dilatam a parede celular; e no grupo 3, esporos esféricos que também dilatam a parede celular. Em geral, esporos esféricos são predominantemente terminais. Quando um esporângio se torna maduro, o seu esporo é lançado ao meio como produto da lise dos envoltórios celulares. Se um esporângio é de bactéria entomopatogênica, após a lise vê-se no meio líquido o esporo e o cristal protéico (corpo paraesporal) livres. Esporos podem ter envoltórios do tipo exosporium, sendo que este, em bactéria entomopatogênica, pode englobar de uma vez o esporo e o corpo paraesporal. Assim, serão vistos quando observados com aumentos da ordem de 1.000 X ou mais. É o que ocorre após a lise de esporângio de *Paenibacillus popilliae*. Entretanto, os esporos de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Lysinibacillus sphaericus* ficam separados, sendo que os esporos estão envolvidos pelo exosporium.



Figura 4: *Lysinibacillus sphaericus*. Esporângio mostrando nucleóide (N) no esporo; membrana do exosporium (EX); cristal de protoxina (CP). Encyclopedia of Entomology 345-348, (2008)

PAREDE CELULAR DE *Bacillus* E GÊNEROS CORRELATOS

O tipo de ácido N-acetilmurâmico (mureína) predominante é o *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP ou m_{A_2pm}), mas outras estruturas são descritas. Sabe-se que em *Lysinibacillus sphaericus* o tipo de mureína decrito em pelo menos cinco linhagens pertence ao tipo L-Lys-D-Asp. Contudo, uma vez que nessa espécie mais de cinco homologias com base em DNA-DNA são conhecidas, a mureína tipo em *Lysinibacillus sphaericus* não pôde ser estabelecida. Enquanto isso, em pelo menos quatro estirpes de *Brevibacillus pasteurii* (ex-*Bacillus*) descreveu-se o tipo de mureína L-Lys-L-Ala-D-Asp. Mas, na espécie tipo derivada da cepa ATCC 1185 (DSM 33) a mureína mostrou a composição básica L-Lys-D-Asp, posteriormente verificada como sendo do tipo L-Lys-L-Ala-D-Asp. Já nas peptidoglicanas de esporos de *Brevibacillus pasteurii* e *Lysinibacillus sphaericus*, encontrou-se a estrutura do ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP). Ácidos teicóicos e teicurônicos já foram detectados em diversas espécies de *Bacillus*, sendo que não se encontrou relações com a taxonomia, assim como também não se encontrou com respeito a polissacarídeos e esse mesmo gênero.

A Tabela 2, a seguir, mostra tipos de ligações cruzadas de ácido N-acetilmurâmico encontradas em paredes de espécies de *Bacillus* e também gêneros correlacionados, incluindo os que já foram anteriormente denominados de *Bacillus*.

Tabela 2. Alguns tipos de mureína encontrados em *Bacillus* e ex-*Bacillus* hoje pertencentes a outros gêneros

<i>Bacillus</i> e ex- <i>Bacillus</i>	Ligações Cruzadas ^(a)	Ano de divulgação
<i>B. subtilis</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. anthracis</i>	(meso-DAP direto) ^(b)	1972
<i>B. aquimaris</i>	meso-DAP	2003
<i>B. bataviensis</i>	DAP ^(b)	2003
<i>B. badius</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. cereus</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. coagulans</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. fastidiosus</i>	meso-DAP direto	1986
<i>B. firmus</i>	(meso-DAP direto)	1972
<i>B. funiculus</i>	DAP ^(b)	2002
<i>B. hwaijinpoensis</i>	meso-DAP direto	2004
<i>B. horti</i>	meso-DAP	1998
<i>B. indicus</i>	L-Orn-D-Asp	2004
<i>B. lentus</i>	(meso-DAP direto)	1972
<i>B. licheniformis</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. marisflavi</i>	meso-DAP ^(b)	2003
<i>B. megaterium</i>	(meso-DAP direto)	1972
<i>B. mycoides</i>	(meso-DAP direto)	1986
<i>B. pumilus</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. thuringiensis</i>	meso-DAP direto	1972
<i>B. vietnamensis</i>	meso-DAP ^(b)	2004
- <i>Bacillus</i> alcalifílicos e Alcalinotolerantes		
<i>B. cohnii</i>	L-Orn-D-Asp	1993
<i>B. halmapalus</i>	Não DAP	1994
- <i>Bacillus</i> Alcalifílico no 6º grupo de rRNA 16S		
<i>B. horikoshii</i>	Não DAP	1994
- <i>Bacillus</i> com esporos predominantemente esféricos		
- <i>Brevibacillus</i>		
<i>Br. brevis</i>	meso-DAP direto	1972
<i>Br. laterosporus</i>	meso-DAP direto	1972
- <i>Geobacillus</i>		
<i>G. stearothermophilus</i>	(meso-DAP direto)	1972
<i>G. thermoleovorans</i>	DAP ^(b)	1972
- <i>Hydrogenibacillus</i>		
<i>Hydrogenibacillus schlegelii</i>	meso-DAP direto	1984

- <i>Lysinibacillus</i>		
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> ^(d)	L-Ly-D-Asp	2007
- <i>Paenibacillus</i>		
<i>P. amylophilus</i> ^(c)	(meso-DAP direto)	1972
<i>P. macerans</i>	meso-DAP direto	1972
- <i>Psychrobacillus</i>		
<i>Psychrobacillus insolitus</i>	Orn-D-Glu	1987
- <i>Rummeliibacillus</i>		
<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	L-Ly-D-Glu	2002
- <i>Salimicrobium</i>		
<i>Salimicrobium halophilus</i>	meso-DAP direto	1989
- <i>Sporolactobacillus</i>		
<i>S. laevolactilis</i>	meso-DAP direto	1994
- <i>Sporosarcina</i>		
<i>S. ureae</i>	L-Lys-Gly-D-Glu	1987
<i>S. psychrophilus</i>	L-Lys-D-Glu	1987
<i>S. pasteurii</i>	L-Ly-D-Asp	1973
- <i>Ureibacillus</i>		
<i>U. thermosphaericus</i>	L-Lys-D-Asp	1995
- <i>Virgibacillus</i>		
<i>V. pantothenicus</i>	meso-DAP direto	1972

(a)= os dados entre parênteses não foram obtidos a partir da espécie tipo. (b)= Configuração não determinada. DAP- ácido diamino-pimélico. (c)= ex- *Bacillus circulans* ATCC9966. A maioria dos *Bacillus* possuem a estrutura: ácido meso- diamino-pimélico (meso – DAP, essa ligação cruzada é chamada DAP-direto. (d)= ex-*B.fusiformis*. Br=Novo gênero *Brevibacillus*. Baseado em: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, Sect. 3. 1986. Peter H.A. Sneath. Editor, N.S. Mair, E. Sharpe Assoc. Ed., Willians e Wilkins, Baltimore. Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, 2nd Ed. The Firmicutes. 2009.

CÁPSULAS

Bactérias Gram-positivas podem produzir dois tipos de cápsulas, que são compostas de ácido poliglutâmico ou polissacarídeos. Contudo, as suas produções por espécies de *Bacillus* não parecem ser expressivas do ponto de vista taxonômico. Linhagens de *Bacillus subtilis* não produzem cápsulas de modo significativo em laboratório, mas a sequência genômica de uma estirpe de número 168 da espécie possui genes que codificam os dois tipos de cápsulas. A produção de ácido poli-glutâmico por *Bacillus subtilis* var. *natto* durante a fase estacionária de crescimento é importante economicamente na produção comercial de soja fermentada, quando se elabora um produto chamado de *natto*.

O ácido poli-glutâmico da cápsula de *Bacillus anthracis* é codificado por três genes localizados no plasmídeo pXO₂, respectivamente (genes *cap A*, *cap B* e *cap C*), que é importante como fator de virulência deste microrganismo, uma vez que linhagens não-capsuladas são avirulentas porque as três enzimas codificadas por esses três genes estão associadas à membrana celular.

As cápsulas são produzidas *in vivo* em condições apropriadas de cultivo em laboratório. *Bacillus anthracis* é um integrante do chamado grupo do *Bacillus cereus*, que está intimamente relacionado às espécies dos grandes *Bacillus* (bactérias com larguras iguais ou superiores a 1 µm). Mas, essas outras espécies não produzem cápsula. Embora plasmídeos homólogos do plasmídeo pXO₁ também tenham sido encontrados na metade de um conjunto de 19 outros membros do grupo *Bacillus cereus* em experimentos de hibridização, uns poucos genes pXO₂ foram capazes de hibridizar com DNA genômico das 19 linhagens de integrantes da espécie *Bacillus cereus*.

DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM *Bacillus* E GÊNEROS CORRELACIONADOS

Os *Bacillus* são células Gram-positivas aeróbias ou aeróbias facultativas, em geral dotadas de mobilidade por meio de flagelos peritríquios, que têm a capacidade de produzir esporo (célula diferenciada não replicativa e mais resistente às condições adversas do meio ambiente, dotada da propriedade de germinar quando se encontra em meio de cultivo que ofereça condições permissíveis), originando célula vegetativa capaz de multiplicação (replicação) e habilitada geneticamente à esporogênese.

As figuras sob microscopia (vide Anexo 31) representam as morfologias das diferenciações dos esporos que ocorrem no gênero *Bacillus* e gêneros correlatos, como *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Gracilibacillus*, *Virgibacillus*, *Paenibacillus* etc, novos gêneros cujas espécies outrora pertenceram ao gênero *Bacillus*.

Tais diferenciações constituem características fenotípicas de morfologia que são observadas nas populações das bactérias esporuladas, com exceção daquelas que são cocos, como as do gênero *Sporosarcina*. As características morfológicas e dimensões são bastante úteis para, juntamente com aquelas fisiológicas e bioquímicas, se determinar a espécie (vide Tabela 3).

Tabela 3: Citomorfologia de *Bacillus* e gêneros correlatos. Posição de esporos no esporângio e dimensões^(5,6)

Largura da forma vegetativa (bastão) -µm	<i>Bacillus subtilis</i>	0,7-0,8	0,9-1,1	0,7-0,9	0,5-0,8	1,0-1,2	0,6-0,9	1,0-1,2	0,5-0,7	0,6-1,0	1,5-2,5	0,6-0,9	0,6-1,0	1,1-1,5	0,5-0,6	0,6-0,8
	<i>Allyclobacillus acidocalcarus</i>	2-3	2-3	3-4	2-5	3-5	1,5-4	1,5-4	2-5	2,5-5	3-6	1,2-4	1,5-5	1,5-2,5	1,5-6	1,5-3
Comprimento do bastão - µm	<i>Bacillus subtilis</i>	- ⁽³⁾	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Esporângio distendido - inchado	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Forma do esporo preponderante	<i>Bacillus subtilis</i>	E	E	Cil	E	Cil	E	Cil	E	E	E	E	S	S	Cil	Cil
	<i>Bacillus subtilis</i>	E	E	Cil	E	Cil	E	Cil	E	E	E	E	S	S	Cil	Cil
Posição do esporo preponderante	<i>Bacillus subtilis</i>	C	T	T	T	ST	ST	ST	ST	ST	ST	C	ST	ST	ST	ST
	<i>Bacillus subtilis</i>	C	T	T	T	ST	ST	ST	ST	ST	ST	C	ST	ST	ST	ST
Corpos parasporais (Cristais)	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	<i>Bacillus subtilis</i>	+	nd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	v	+	v	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	+	nd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	v	+	v	+

(5) Baseado em: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, Sect. 3, 1986, Peter H.A. Sneath, Editor, N.S. Mair, E. Sharpe Assoc. Ed., Willians e Wilkins, Baltimore. (6) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, 2nd Ed. The Firmicutes, 2009. Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. Aidan C. Parte, Manag. Ed., Springer. (3) + = esporângio distendido (inchado); - = esporângio não distendido; E = Elítico; Cil = Cilíndrico; S= Esférico; C= Central; T= Subterminal; LD= Levemente distendido; nd: não determinado; v= Variável.

Tabela 3a: Citomorfologia de *Bacillus* e gêneros correlatos. Posição de esporos no esporângio e dimensões^(7,8)

Largura da forma vegetativa (bastão) - µm	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	0,5-0,6	0,5-0,7	0,6-0,9	0,5-0,7	0,9-1,2	1,2-1,5	1,0-1,2	0,5-0,7	0,5-1,2	0,6-0,8	0,6-0,7	0,6-0,8	0,6-1	1-1,2	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	1,5-6	1,2-7	1,2-4	2,5-5	2-4	2-5	2-5	3-5	1,3-4	2-5	2-3	2,5-5,8	1,5-5	2-3,5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Comprimento do bastão - µm																
Esporângio distendido - inchado	+(3)	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	LD/-	-
Forma do esporo preponderante	E	Cil	E	E	S	E	E	Cil	E	S	E	E	S	S	C	Cil
Posição do esporo preponderante	Cil	ST	C	T	T	C	C	ST	T	ST	T	ST	T	T	T	ST
Corpos parasporais (Cristais)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Motilidade	+	-	+	+	nd	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+

(7) Baseado em: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, Sect. 3. 1986. Peter H.A. Sneath, Editor, N.S. Mair, E. Sharpe Assoc. Ed., Willians e Wilkins, Baltimore. (8) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, 2nd Ed. The Firmicutes. 2009. Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. Aidan C. Parte, Manag. Ed., Springer. (3) + = Esporângio distendido (inchado); - = Esporângio não distendido; E = Elítico; Cil = Cilíndrico; S= Esférico; C= Central; T= Terminal; ST= Subterminal; LD= Levemente distendido; v= Variável

Tabela 3b: Citomorfologia de *Bacillus* e gêneros correlatos. Posição de esporos no esporângio e dimensões (9,10)

Largura da forma vegetativa (bastão) - µm	<i>Solibacillus silvestris</i>	0,5-0,7	0,7-0,9	0,6-1,2	0,7-1,2	0,5-0,7	0,6-0,8	0,3-0,4	0,4-0,6	0,5-1	0,9-1,2	0,5-0,7	1-1,3	1,0	0,6-0,7	1-1,2	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	
	<i>Bacillus simplex</i>	nd	nd	nd	nd	3-5	3-6	3-7	2-5	2,5-9	2-4	1-6	2,5-4	3-5	nd	3,7-5,4	<i>Bacillus cohnii</i>	
Comprimento do bastão - µm	<i>Bacillus soli</i>	nd	nd	nd	nd	3-5	3-6	3-7	2-5	2,5-9	2-4	1-6	2,5-4	3-5	nd	3,7-5,4	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	
	<i>Bacillus bataviensis</i>	+	+	v	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Bacillus hwayinpoensis</i>	
Esporângio distendido - inchado	<i>Bacillus bataviensis</i>	+	+	v	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Ureibacillus thaerosphaericus</i>	
	<i>Bacillus vvederi</i>	-	-	v	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Jeogalibacillus marinus</i>	
Forma do esporo preponderante	<i>Bacillus vvederi</i>	S	E	E	E	E	E	S	S	E	S	Cil	E	E	E	nd	<i>Halobacillus halophilus</i>	
	<i>Bacillus bataviensis</i>	T	C	C	C	ST	C	T	T	nd	T	T	C	nd	T	C	<i>Gracilibacillus halotolerans</i>	
Posição do esporo preponderante	<i>Bacillus vvederi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Fillobacillus milosensis</i>
	<i>Bacillus bataviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus pseudofirmus</i>
Corpos paraesporais (Cristais)	<i>Bacillus vvederi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus vvederi</i>
	<i>Bacillus bataviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus bataviensis</i>
Motilidade	<i>Bacillus vvederi</i>	+	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus vvederi</i>
	<i>Bacillus bataviensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus bataviensis</i>

(9) Baseado em: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, Sect. 3, 1986. Peter H.A. Sneath, Editor, N.S. Mair, E. Sharpe Assoc. Ed., Williams e Wilkins, Baltimore. (10) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, 2nd Ed. The Firmicutes, 2009. Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman. Aidan C. Parte, Manag. Ed., Springer. (3) + = Esporângio distendido (inchado); - = Esporângio não distendido; E = Elítico; Cil = Cilíndrico; S = Esférico; C = Central; T = Terminal; ST = Subterminal; LD = Levemente distendido; nd = não determinado; v: Variável

A Fig. 13 (vide Anexo 32) mostra como se aborda a tomada de medidas de células vegetativas e esporos, determinação que se realiza em microscópio ótico comum que possui régua com escala micrométrica na ocular, obtendo-se as dimensões de largura e comprimento em micrometros (μm).

Por vezes, verifica-se que espécies de um mesmo gênero, pelo fato de apresentarem características fenotípicas e genotípicas muito semelhantes, são grupadas por alguns pesquisadores em conjuntos denominados de grupo. É o caso do *Bacillus cereus* e espécies próximas como *B. mycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cytotoxicus* e o psicrotolerante *B. weihenstephanensis*.

Tabela 4 : Exemplo de algumas características diferenciais para a separação dos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* e *Virgibacillus*

	<i>Bacillus</i>				<i>B. megaterium</i>	Grupo <i>B. circulans</i>			
	Grupo <i>B. subtilis</i>		Grupo <i>B. cereus</i>			<i>B. circulans</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. coagulans</i>
Crescimento anaeróbico	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Crescimento em:									
50 °C	v	v	+	v	-	-	-	-	+
65 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação da gema do ovo	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Hidrólise da caseína	+	+	+	+	+	+	+	v	v
Hidrólise de amido	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginina diidrolase	-	-	v [(-)]	-	v [(-)]	-	-	-	v
Produção de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise da gelatina	+	+	+	(+)	+	+	+	v	-
Redução de nitrato	+	+	(+)[+]	+	+	+	v (+)	(+)	(-)

Grás de carboídratos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formação de ácido por:																			
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicogénio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuulina	(+)	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Salicina	+	+	+	+	+	+	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degradação da tirosina	-	-	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Símbolos. +: ≥85% positivo; (+): 75% ou 84% positivo; v, variável (26% a 74% positivo); (-): 16% a 25% positivo; -: 0 a 15% positivo. Arginina diidrolase, produção de indol, hidrólise da gelatina, redução do nitrato, são reações determinadas com o emprego de tiras do API20 E (bioMérieux). Reações de carboídratos são determinadas com o emprego de API 50(bioMérieux).

PROCEDIMENTOS MÍNIMOS PADRONIZADOS PARA A DESCRIÇÃO DE NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *Bacillus* E BACTÉRIAS RELACIONADAS

Tais procedimentos foram elaborados, ordenados e sugeridos pelo Sub-Comitê de Taxonomia do Gênero *Bacillus*, Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática, em setembro de 1999 (Logan et al., 2009), com o título: “Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria”.

As propriedades a serem pesquisadas com estes procedimentos estão listadas a seguir, e os meios de cultura e os métodos a serem empregados são aqueles preconizados por Claus & Berkeley (1986), a não ser que hajam outras indicações como por exemplo o sistema padronizado API¹¹, que se utiliza de uma série de 49 açúcares para a revelação de caracteres fenotípicos (Logan & Berkeley, 1984). Outros procedimentos mínimos se baseiam nos clássicos estudos de Smith, Gordon & Clark (1952) e Gordon, Haynes & Pang (1973).

1. Exigência geral - procedimentos

1.1. Isolamento

1.1.1. O número de linhagens a ser estudado não deve ser inferior a cinco. Idealmente devem ser dez ou mais, que devem ser isoladas normalmente de uma ou mais regiões, pelo menos um mínimo de três. É desejável que seja tentado o isolamento de mais linhagens de habitats diferentes

1.1.2. Cada localização, habitat ou fonte de isolamento deve ser descrita

1.1.3. Os procedimentos de isolamento devem ser amplamente especificados e deve-se incluir detalhes de formulação, pH, meio de cultura inoculado, temperatura, condições de aeração e tempo de incubação

1.2. Cultivo

1.2.1. Os procedimentos rotineiros de cultivo devem ser plenamente especificados e deve-se incluir detalhes de formulação, pH, meio de cultura, temperatura, condições de aeração e tempo de incubação

1.2.2. Devem ser dados os detalhes das condições e tempo para esporulação

1.3. Manutenção

1.3.1. Os procedimentos de manutenção devem ser amplamente especificados

1.3.2. Pelo menos duas linhagens de referência devem ser depositadas em uma coleção de culturas internacional, juntamente com a linhagem tipo

11. API <http://apiweb.biomerieux.com/servlet/authenticate?action=preparelogin> ou www.biomerieux-diagnostics.com. Logan et al. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. Int. J. Syst. Evol. Micr., 59: 2114-2121(2009). API 50 CH

- 1.4. Uma linhagem de referência de outra espécie preferencialmente relacionada de modo fenotípico e/ou filogenético, deve ser incluída nos estudos de caracterização. Comparações baseadas em dados já existentes, embora de valor para a indicação de organismos de referência, por si só não são suficientes

1.5. Controle de qualidade

- 1.5.1. Linhagens de *Bacillus* e de gêneros correlacionados já conhecidos e que forneçam resultados positivo e negativo devem ser incluídos para o fim de comprovação dos caracteres fisiológicos e bioquímicos
- 1.5.2. Devem ser usados controles para marcadores genômicos como “fingerprint” de DNA ou RNA, ou homologia de DNA:DNA

2. Caracteres morfológicos e tintoriais

As condições de crescimento deverão ser fornecidas (vide item 1.2.1.)

- 2.1. Características das células vegetativas a serem observadas
- 2.1.1. Forma da célula
- 2.1.2. Tamanho da célula
- 2.1.3. Presença ou ausência de motilidade (fornecer a idade da cultura)
- 2.1.4. Presença ou ausência de inclusões citoplasmáticas
- 2.2. Característica do esporângio a serem observadas
- 2.2.1. Forma do esporângio, posição e forma do endósporo, presença ou ausência de corpos para-esporais ou cristais
- 2.2.2. Fotomicrografia mostrando a morfologia do esporângio a 1500 x
- 2.3. Método de coloração de Gram ou teste do KOH de culturas jovens (fornecer a idade)

3. Caracteres coloniais

Usando um meio de cultura especificado e com detalhes das condições de crescimento, descrever:

- 3.1. Forma e tamanho das colônias
- 3.2. Pigmentação das colônias
- 3.3. Motilidade das colônias (caso exista)
- 3.4. Deve-se apresentar fotografia mostrando colônias típicas

4. Características fisiológicas

- 4.1. Faixa de temperatura de crescimento e temperatura ótima de crescimento

4.2. pH

4.2.1. Faixa de pH para crescimento e pH ótimo de crescimento

4.2.2. Crescimento em pH 5,7 (não considerar se estiver informado pelo sub-item 4.2.1.)

4.3. Crescimento em presença de oxigênio (metabolismo respiratório)

4.3.1. Crescimento anaeróbico sem acceptor externo de elétron

4.3.2. Crescimento anaeróbico com Nitrato

4.4. Crescimento em presença de NaCl em diferentes concentrações

4.4.1. Inibição de crescimento por NaCl

4.4.2. Exigência de NaCl (se existir)

4.5. Especificar alguma exigência nutricional (exemplo, requerimento de metionina)

4.6. Propriedade de crescer em meio de cultura mínimo (descrever em que condições)

5. Características bioquímicas avaliadas através das seguintes provas

5.1. Catalase

5.2. Oxidase

5.3. Reação de Voges-Proskauer

5.4. Redução do Nitrato a Nitrito

5.5. Formação de gás a partir de Nitrito

5.6. Formação de ácido a partir de:

5.6.1. D-Glicose

5.6.2. L-Arabinose

5.6.3. D-Xilose

5.6.4. D-Manitol

5.6.5. Outros carboidratos de importância diferencial

5.7. Formação de gás a partir de carboidratos

5.8. Hidrólise de:

5.8.1. Amido

5.8.2. Gelatina

5.8.3. Caseína

5.8.4. Hipurato

5.8.5. Uréia

5.9. Degradação da tirosina e formação de pigmento de tonalidade marrom

5.10. Utilização do citrato

5.11. Utilização do propionato

5.12. Reação da gema de ovo (lecitinase)

5.13. Fenilalanina desaminase

5.14. Produção de indol

5.15. Produção de dihidroxiacetona a partir do glicerol

5.16. ONPG

5.17. Hidrólise da arginina

6. Caracteres quimiotaxonômicas

As condições experimentais devem ser precisas.

As informações de marcadores quimiotaxonômicos (como ácido diaminopemérico da parede celular, lipídeos polares, ácido graxos, isoprenoíde-quinonas, poliaminas, e proteínas totais celulares obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida) são recomendadas com ênfase, caso sejam de valor diferencial.

7. Estudos dos ácidos nucléicos

Devem ser dadas as condições experimentais com precisão, e o significado da relação taxonômica implicada deve ser especificada em termos do método aplicado.

7.1. Conteúdo de bases no DNA (mol% G+C).

7.2. Homologia de DNA.

7.3. “Fingerprints” de ácidos nucléicos e, ou, informações sobre seqüenciamentos são de grande importância.

Observações:

- Nem todos os laboratórios estão preparados para pesquisar todos os caracteres aqui listados e, portanto, ficam recomendadas as colaborações com técnicos experimentados de outros laboratórios que ordinariamente determinam tais caracteres. O Sub-Comitê de Taxonomia do Gênero *Bacillus* pode ajudar, indicando tais colaboradores.
- Linhagens de *Bacillus* e gêneros bacterianos correlacionados a serem utilizados como controles positivos e negativos dos ensaios estão relacionados em Claus & Berkeley (1986).
- Para maiores detalhes, vide o Anexo 39, Súmula de Rota para Identificação, Caracterização Celular e Determinação da Espécie de Bastão Esporulado, Gram-Positivo, Aeróbio ou Aeróbio Facultativo.

CAPÍTULO 1: MEIOS PARA CULTIVO E ISOLAMENTO

1.1. CALDO NUTRIENTE - CN

	g/L
Peptona de carne	5
Extrato de carne	3
Água destilada ¹² ou equivalente	qsp

pH 7,4

⇒ Dissolver em 80% de água, ajustar o pH com NaOH 1N, completar o volume, distribuir e autoclavar a 121°C durante 20 min.

1.2. ÁGAR NUTRIENTE - AN

⇒ Ao meio Caldo Nutriente, adicionar 15 g/L de Ágar-ágar. Fundir e distribuir. Autoclavar a 121°C durante 20 min.

1.3. ÁGAR NUTRIENTE – ANCTC

Para manutenção de *Bacillus stearothermophilus*.

	g/L
Extrato de carne ^(*)	1
Peptona de carne	5
Extrato de levedura	2
NaCl	5
Ágar-ágar	15
Água destilada ou equivalente	qsp

pH 7,4

⇒ Dissolver em 80% de água, ajustar o pH com NaOH 1N, completar o volume e adicionar o Ágar-ágar.
⇒ Fundir e distribuir em tubos. Autoclavar a 121°C durante 20 min.

^(*)Isento de carboidratos

12. A água destilada referenciada nos Meios para Cultivo e Isolamento ou, Meios de Cultura e Soluções e as características técnicas mencionadas neste Manual conforme o Anexo 1- ÁGUA REAGENTE E SOLVENTE NO LABORATÓRIO DE PESQUISA MICROBIOLÓGICA, encontra-se à página 67

1.4. CALDO-J

	g/L
Glicose	2
Triptona	5
Extrato de levedura	15
K ₂ HPO ₄	3
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,3 - 7,5	

- ⇒ Dissolver os componentes (exceto a glicose) em 900 mL de água
- ⇒ Ajustar o pH com NaOH 1N e autoclavar a 121°C durante 20 min.
- ⇒ À esta solução, resfriada, adicionar asseticamente 100 mL de solução de glicose a 2%, previamente autoclavada a 121°C durante 15 min.

Observações:

- O Caldo-J é usado para cultivar *Paenibacillus larvae* (ex- *B. larvae*), *Paenibacillus popilliae* (ex- *B. popilliae*) e *Paenibacillus lentimorbus* (ex- *B. lentimorbus*) e correlatos, bactérias de crescimento lento e de nutrição fastidiosa, sendo alguns patogênicos para insetos.
- O *P. popilliae* produz a chamada “milky disease” (doença “leitosa”).
- Ao saírem dos meios-estoque, as bactérias acima são passadas para Ágar-J Difásico (visando a manutenção por repiques sucessivos) ou para Ágar-J Semi-Sólido (com 0,1% de Ágar-ágar).

1.5. ÁGAR-J

- ⇒ Ao meio Caldo-J, adicionar 20 g/L de Ágar-ágar
- ⇒ Fundir e distribuir. Autoclavar a 121°C durante 20 min.

1.6. ÁGAR-J DIFÁSICO

- ⇒ Preparar usando as concentrações dos componentes do Ágar-J em dobro, inclusive a concentração do Ágar-ágar que passa para 4%.

Observações:

- O meio destina-se a adaptação do *P. lentimorbus* para que as linhagens se tornem menos fastidiosas. Por outro lado, repiques sucessivos em Ágar Nutriente, ou mesmo em Ágar-J, conduzem à inativação da cultura, como ocorre com o *P. larvae*; isto se deve, em parte, ao baixo teor ou mesmo ausência de tiamina no Ágar Nutriente. Para que isso não ocorra daí usa-se o Ágar-J Difásico.

1.7. ÁGAR EXTRATO DE SOLO – AES (*)

	g/L
Peptona de carne	5
Extrato de carne	3
Extrato de solo estéril	q.s.(%)*
Ágar –ágar	15
Água potável	qsp
pH 7,0	

- ⇒ Dissolver os componentes em 80% da água, ajustar o pH com NaOH 1N
- ⇒ Completar o volume e adicionar o Ágar-ágar
- ⇒ Fundir e distribuir em tubos de rosca de 15x120 mm ou 15x150 mm
- ⇒ Autoclavar a 121°C durante 20 min.
- ⇒ Inclinar os tubos. *A experiência do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, mostra que nesta fase pode-se usar de 10% a 15% de Extrato de Solo estéril, preparado como abaixo. A percentagem final para uso é determinada ensaiando-se, em cada caso, uma cultura de *Bacillus subtilis*, aplicando a percentagem de Extrato de solo que melhor produzir esporulação após três dias de incubação à temperatura de 35°C.

Observação:

- No caso dos *Bacillus* fastidiosos ou gêneros correlatos patogênicos para insetos usa-se cultivá-los em Ágar-J Semi-Sólido (0,1% de Ágar-ágar), ou em Ágar-J Difásico.

1.8. EXTRATO DE SOLO

- ⇒ Dessecar solo de jardim rico em material orgânico
- ⇒ Espalhar em camada fina sobre papel
- ⇒ Pulverizar por agitação
- ⇒ Secar e peneirar em peneira grossa
- ⇒ Colocar 400 g em frascos de 2 L e misturar com 960 mL de água potável
- ⇒ Autoclavar por 1 h a 121°C
- ⇒ Deixar o frasco permanecer por uma noite na autoclave
- ⇒ Decantar o extrato frio com cuidado e filtrar por papel
- ⇒ Autoclavar porções de 300 mL, distribuídas em frascos menores, a 121°C por 40 min, e deixar permanecer à temperatura ambiente por duas semanas ou mais. Durante o período forma-se um sedimento que deixa um sobrenadante claro para ser decantado e esterilizado (121°C, 30 min) para ser utilizado.

1.9. MEIO SABOURAUD DEXTROSE. Verificação do crescimento em pH 5.7

A. Ágar Sabouraud Dextrose.

	g/L
Neopeptona*	10
Glicose [D(+) Dextrose]	40
Ágar-ágar	15
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 5,7	

B. Caldo Sabouraud Dextrose.

	g/L
Neopeptona*	10
Glicose	20
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 5,7	

(*) Peptona especial de Difco Laboratories - Detroit, utilizada em meios de cultura destinados para microrganismos fastidiosos.

A. Ágar Sabouraud Dextrose

- ⇒ Dissolver os componentes em 80% de Água destilada, ajustar o pH com NaOH 1N, completar o volume e adicionar o Ágar-ágar
- ⇒ Fundir, resfriar até aproximadamente 45°C e distribuir em tubos de rosca de 15 mm x120 mm com tampas de rosca frouxas
- ⇒ Autoclavar a 121°C durante 21 min
- ⇒ Inclinat até o resfriamento e apertar as tampas.

B. Caldo Sabouraud Dextrose

- ⇒ Dissolver os componentes em 80 % de Água destilada ou equivalente e, se necessário, ajustar o pH com NaOH 1N e completar o volume
- ⇒ Distribuir em tubos de 15x120 mm com tampas de rosca afrouxadas.
- ⇒ Autoclavar a 121°C durante 20 min.

A partir de alças cheias com crescimento em Caldo Nutriente, inocular o Ágar Sabouraud Dextrose e o Caldo Sabouraud Dextrose. Inocular também um tubo com Caldo Nutriente, como controle. Incubar à temperatura de 33°C até 35°C. O crescimento em um ou nos dois meios Sabouraud obtidos em até 14 dias de incubação, é considerado como ocorrido em pH 5,7.

1.10. MEIO CALDO GLICOSADO – VP, e para o teste de Voges-Proskauer Pesquisa de acetoína (acetil-metil-carbinol)

Caldo Glicosado:	g/L
Proteose peptona	7
Glicose [D(+) Dextrose]	5
NaCl	5
Água destilada ou equivalente	qsp
pH	6,5

- Preparar o Caldo Glicosado dissolvendo os componentes da fórmula em 80% da água, conferir o pH e completar o volume (para *Bacillus* esta fórmula não contém K_2HPO_4)
- Distribuir 5 mL a 6 mL em tubos com 15x100 mm, com tampa de rosca
- Autoclavar a 121°C durante 20 min. Resfriar
- Inocular cada linhagem em triplicata, com auxílio de alça bacteriológica, cheia de cultura obtida em Caldo Nutriente
- Testar a presença de acetoína com 3, 5 e 7 dias de incubação à temperatura de 33°C - 35°C, misturando 3 mL de NaOH 1N seguindo-se homogeneização e adição de 0,5 mg a 1 mg de creatina colhida com a ponta fina de uma espátula
- O aparecimento de cor vermelha após 30 a 60 min, à temperatura ambiente, denota a presença de acetoína.

No caso do uso do Caldo-J, a concentração de glicose é de 0,5% e o K_2HPO_4 é excluído. O meio é autoclavado a 121°C durante 15 min e o pH final deverá ser de aproximadamente 6,5. Inocular as linhagens, em triplicata, e fazer a pesquisa de acetoína como anteriormente descrito.

Observações:

- Quando a bactéria for termofílica, a temperatura de incubação será de 45°C. Em alguns poucos casos, o tempo de incubação pode ser de 10 a 20 dias. Em todos os casos, os tubos são incubados inclinados (ângulo de 35°).
- Para as espécies de *Bacillus*, não fastidiosas, o teste de VP é feito no Meio Caldo Glicosado- VP.
- Para as espécies fastidiosas, o teste de VP é feito no meio Caldo J.

- Alternativamente, pode-se empregar os seguintes reativos para o teste de VP (Standard Methods da APHA, 1946)¹³. Para 1 mL de cultivo, adicionar 0,6 mL de α -naftol a 5% em álcool etílico absoluto e 0,2 mL de KOH a 40%. É importante agitar os tubos por 5 s após a adição de cada reagente. O desenvolvimento de coloração carmim ou rubra na mistura, a partir de 2 h até 4 h após a adição dos reagentes, constitui resposta positiva para acetoína.

13. APHA. 1946. American Public Health Association. "Standard Methods for the Examination of water and Sewage", 9 th ed., Published by the Association, New York.

pH NO MEIO CALDO GLICOSADO DE VOGES -PROSKAUER (VP)

Antes da determinação da presença da acetoína no Meio Caldo Glicosado, empregado no teste de VP, determinar o valor do pH no sétimo dia de cultivo. Determinar com eletrodo de potenciômetro desinfetando-o ao final.

1.11. MEIO NYSM (Myers & Yousten, 1980)

	g/L
Caldo Nutriente desidratado	8
Extrato de levedura	0,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,01
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
Água destilada ou equivalente	qsp
pH	6,8

- ⇒ Dissolver os componentes em 80% da água, ajustar o pH com NaOH 1N e completar o volume
- ⇒ Distribuir e autoclavar a 121°C durante 20 min.

Observação:

- O meio poderá ser preparado a partir de Caldo Nutriente-CN, bastando adicionar os demais componentes na concentração descrita para a fórmula.

1.12. MEIO NYSM – SÓLIDO (Myers & Yousten, 1980)

- ⇒ Ao meio NYSM, adicionar 15 g/L de Ágar-ágar
- ⇒ Fundir e distribuir
- ⇒ Autoclavar a 121°C durante 20 min.

1.13. MEIO DE CIANETO DE POTÁSSIO (Barjac, H.de, 1982)

Verificação de crescimento em meio de Cianeto de Potássio

1. Meio básico:	g/L
Peptona de carne	3
Cloreto de sódio	5
KH ₂ PO ₄	0,225
Na ₂ HPO ₄	5,64

Água destilada ou equivalente qsp
pH 7,6

- Distribuir em frascos com volumes de 100 mL
- Esterilizar a 120°C por 15 min.

2. Solução de KCN a 0,5%, esterilizada por filtração através de membrana. Atenção ao manipular a solução, pois o cianeto de potássio é altamente tóxico. Guardar a solução no refrigerador em frasco bem vedado com tampa de rosca.

Preparação:

- A cada 100 mL do Meio básico estéril, a frio, adicionar 15 mL da solução a 0,5% de KCN recém preparada e estéril
- Distribuir, assepticamente, quantidades de 1,5 mL, em tubos pequenos (12x100 mm) contendo tampa de borracha, rolha parafinada etc. Conservar a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ por até duas semanas
- Semear a bactéria com alça de platina, evitando microgotas, partindo de uma cultura de 24 h
- Incubar na temperatura de 35°C. Observar por 48 h.
- Usar testemunhos positivos e negativos. Havendo turvação nítida o resultado é positivo.

1.14. MEIO DE HIPURATO

Verificação da hidrólise do hipurato

	g/L
Triptona	10
Extrato de Carne	3
Extrato de levedura	1
Glicose	1
Na ₂ HPO ₄	5
Hipurato de sódio	10
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7	

- ⇒ Dissolver os componentes (exceto a glicose) em 900 mL de água previamente aquecida a 60°C
- ⇒ Ajustar o pH com NaOH 1N e autoclavar a 121°C durante 20 min
- ⇒ A esta solução resfriada, adicionar aseticamente 100 mL de solução de glicose a 1%, autoclavada a 121°C durante 15 min
- ⇒ Para os *Bacillus* fastidiosos (*P.larvae*, *P. popilliae* e *P. lentimorbus*) emprega-se o Caldo-J contendo 1% de hipurato de sódio
- ⇒ Distribuir aseticamente 6 mL do meio em tubos 15x120 mm, com tampa de rosca, estéreis
- ⇒ Inocular com alça bacteriológica cheia, contendo o inóculo bacteriano, obtido por raspagem de crescimento de 24 h a 48 h em Ágar Nutriente - ANCTC ou Ágar-J, se for o caso
- ⇒ Incubar à temperatura de 33°-35°C durante 30 dias
- ⇒ Decorridos os 30 dias, transferir 1 mL do cultivo para tubo e misturar com 1,5 mL de H₂SO₄ a 50%. O aparecimento de cristais na mistura ácida evidencia que houve formação de ácido benzóico pela hidrólise do hipurato.

1.15. VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE AZIDA SÓDICA (Caldo azida- dextrose)

	g/L
Triptona	15
Extrato de carne	4,5
Glicose [D(+)] Dextrose]	7,5
NaCl	7,5
Azida sódica	0,2
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,2	

- ⇒ Dissolver os componentes, exceto a glicose, em 900 mL de água previamente aquecida a 60°C
- ⇒ Ajustar o pH com NaOH 1N e autoclavar a 121°C durante 20 min
- ⇒ A esta solução resfriada, adicionar aseticamente 100 mL de solução de glicose a 7,5%, previamente autoclavada a 121°C durante 15 min
- ⇒ Misturar as soluções aseticamente e distribuir 6 mL da mistura em tubos 15x120 mm, com tampa de rosca, estéreis
- ⇒ O inóculo é feito a partir de um cultivo em Caldo Nutriente incubado a 45°C
- ⇒ Uma alça é retirada e transferida para o Caldo Azida-Dextrose e, ao mesmo tempo, inocular também um tubo contendo Caldo Nutriente
- ⇒ Incubar ambos em banho-maria a temperatura de 55°C e observar a ocorrência de crescimento com 7 dias e 14 dias

Observações:

- Somente as culturas capazes de crescer a temperatura de 55°C ou mais, costumam ser testadas para resistência a 0,2% de Azida sódica
- Manter as tampas de rosca bem apertadas durante a incubação

1.16. MEIO VRM PARA CONTAGEM DE *Bacillus cereus**

Teste da lecitinase

	g/L ou mL/L
Triptona	10
Tris-(hidroximetil)aminometano	1,21
NaCl	5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
Resazurina	0,01
Ágar-ágar	14
Gema-de-ovo	50
Água destilada ou equivalente	qsp

- Dissolver nesta ordem o Tris, os sais, a triptona em 500 mL de água destilada e ajustar o volume até 950 mL
- Passar para balão de 2 L de capacidade e adicionar a resazurina
- Misturar para dissolver
- Adicionar o ágar e fechar o recipiente
- Autoclavar a 121°C durante 15 min, sem dissolver previamente o Ágar-ágar
- Resfriar a 45°C
- Adicionar aseticamente 50 mL de gema de ovo (previamente homogeneizada em recipiente estéril, empregando bastão magnético)
- Misturar para homogeneizar e distribuir em placas de Petri
- O *Bacillus cereus* produz colônias típicas na superfície deste meio com a coloração creme, ou amarelo-pálido, sendo a cor mais intensa no centro da colônia. A hidrólise da gema de ovo (lecitina) aparece sob a forma de um halo turvo contornando as colônias, podendo ser levemente corado em rosa, em contraste com o restante do meio de cultura que permanece com a cor rosa mais intensa. As tonalidades creme e amarelo-pálido podem ser reforçadas com a adição à fórmula de 0,5% de Manitol.

Observações:

- Após a secagem da superfície do meio VRM em estufa, as placas de Petri podem ser armazenadas dentro de sacos plásticos e guardadas em refrigerador. Podem ser usadas em até 60 dias. O *Bacillus megaterium* tem seu crescimento inibido neste meio pelo menos por 72 h. O *Bacillus thuringiensis* pode crescer e apresentar colônias lecitinase-positivas. Neste caso, examinar esfregaços corados pelo método de Gram, em busca de corpos para-esporais.
- O meio VRM pode ser usado para comprovar a atividade de hidrólise da lecitina da gema de ovo. Neste caso, inocular as culturas-puras por picada de agulha na superfície do meio.

*Este meio de cultura foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Bacteriana, do Instituto Oswaldo Cruz. Vasconcellos & Rabinovitch. A New Formula for an Alternative Culture Medium, Without Antibiotics, for Isolation and Presumptive Qualification of *Bacillus cereus* in Foods. J. Food Protection, 58:(3) 235-238 (1995).

1.17. CALDO MBS

Meio para cultivo de *Lysinibacillus sphaericus*

A. Meio

	g/L ou mL/L
KH_2PO_4	6,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
Triptose (Bacto)	10
Extrato de levedura	2
Solução-mãe de metais	10
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,2	

B. Solução-mãe de metais

	g/L
MnSO_4	2
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
Água destilada ou equivalente	qsp

- ⇒ Dissolver os componentes em 80% de água e incluir a solução-mãe de metais ao meio
- ⇒ Ajustar o pH com NaOH 1N, completar o volume
- ⇒ Distribuir
- ⇒ Autoclavar a 121°C durante 20 min.

1.18. ÁGAR MBS

- ⇒ Meio para cultivo de *Lysinibacillus sphaericus*
- ⇒ Ao meio Caldo MBS, adicionar 15g/L de Ágar-ágar
- ⇒ Fundir e distribuir
- ⇒ Autoclavar a 121°C durante 20 min.

1.19. MEIO ANM LÍQUIDO¹⁴

	g/L
Caldo Nutriente (Difco)	8
NaCl	15
Mg ²⁺ (como MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,01
Mn ²⁺ (como MnSO ₄ .H ₂ O)	0,01
Água destilada ou equivalente	qsp

- Dissolver os componentes em 80% de água destilada
- Ajustar o pH com NaOH 1N. Completar o volume
- Distribuir
- Autoclavar a 121°C durante 15 min

Observações:

- Para preparar o meio sólido, acrescentar 1,3%-1,5% de Ágar-ágar.
- Este meio é utilizado para o estímulo à esporulação do *B.licheniformis* e outros *Bacillus*.
- Preparar soluções estoque de metais. Em solução aquosa contendo 10,25 mg de MgSO₄.7H₂O por mL encontra-se 1 mg de Mg²⁺/mL. Em solução contendo 3,073 mg de MnSO₄.H₂O por mL encontra-se 1 mg de Mn²⁺/mL.

1.20. MEIO PARA *BACILLUS CEREUS* BCM

(Meio seletivo para diagnóstico contendo lecitina de ovo)

	g/L ou mL
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,02
Extrato de levedura	0,02
D-Manitol	1,0
Ágar-ágar	2,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,1
K Cl	0,02
Púrpura de bromocresol	0,004
Água destilada ou equivalente	qsp

- Determine o pH=7,0 antes de esterilizar a 121°C (15 lb/in²) durante 15 min
- Resfriar a 50°C e juntar 10 mL de emulsão de gema de ovo(*) a 20%
- Misturar suavemente e dispensar em placas de Petri
- Secar em estufa bacteriológica e guardar em sacos plásticos, em refrigerador (3°C ±1°C) por até 90 dias.

14. Balows, A [Editores: Hansler Jr. W.J.; Herrman, K.L., Isenberg, H.D and Shadomy, H.J.]. 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Observação:

- Inocular por espalhamento buscando obter colônias isoladas.
- Verificar a presença de precipitação ao redor das colônias e a coloração do precipitado (róseo).
- A cor amarela advém da fermentação do D-Manitol e se localiza também ao redor da colônia.

(*) É possível usar-se 15% de gema de ovo em pó industrializada para fins microbiológicos (Difco ou similar).

1.21. ÁGAR ANAERÓBICO¹⁵

	g/L
Casitone (Difco)**	20
Cloreto de sódio	5
Dextrose	10
Ágar-ágar (Difco)**	20
Tioglicolato de sódio (Difco)**	2
Formaldeído sulfoxilato de sódio	1
Azul de metileno	0,002
Água destilada ou equivalente	qsp

- ⇒ Dissolver os ingredientes em 700 mL de água destilada e aquecer suavemente até dissolver o Ágar-ágar
- ⇒ Distribuir 6 mL em tubos com tampa de rosca (12 x 100 mm) ou em placas de Petri
- ⇒ Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 min
- ⇒ Os tubos são mantidos em pé
- ⇒ Após o resfriamento apertar as tampas

Observação:

- Conservar no refrigerador (3°C ± 1°C) por até 06 meses
- Usar sacos plásticos para evitar desidratação rápida
- Inocular com agulha bacteriológica introduzindo-a até 2 cm da superfície
- Incubar por até 48 h à 33-35°C

O Ágar Anaeróbico é também comercializado e (**) pode ser de procedência similar e mesma fórmula.

15. Balows, A [Editores: Hansler Jr. W.J.; Herrman, K.L., Isenberg, H.D and Shadomy, H.J.]. 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, American Society for Microbiology, Washington, DC.

1.22. ÁGAR MUELLER HINTON

	g/L
Infuso de carne	300
Caseína Hidrolisada (Casamino Acids)	17,5
Amido	1,5
Ágar-ágar	17
Água destilada ou equivalente	qsp

- ⇒ Dissolver quantidade recomendada pelo fabricante do produto desidratado em 500 mL de água destilada colocada em Becher de 1 L
- ⇒ Aquecer até dissolver, se necessário ferver por 1 min
- ⇒ Completar o volume ao litro passando para proveta
- ⇒ Distribuir e esterilizar em autoclave a 121°C por não mais de 15 min
- ⇒ O pH final deverá ser 7,4 (se necessário ajustar com Solução de NaOH 1N)
- ⇒ Difco e Oxoid têm formulações diferentes

Observação:

- Produtos Difco e Oxoid têm formulações diferentes entre si.

1.23. ÁGAR PLATE COUNT (PCA)

	g/L
Triptona	5
Extrato de Levedura	2,5
D (+) Glicose	1
Ágar – ágar	15
Água destilada ou equivalente	qsp

pH 7,0

- ⇒ Suspender 23,5 g em 1 L de Água destilada até dissolver por completo
- ⇒ Esterilizar na autoclave por 15 min a 121°C.

CAPÍTULO 2: PROVAS BIOQUÍMICAS

2.1. MEIO DE NITRATO

Verificação da redução do nitrato a nitrito

	g/L
Peptona de carne	5
Extrato de carne	3
KNO ₃	1
Água destilada ou equivalente	qsp

pH 7,0

- Dissolver os componentes em 95% da água, ajustar o pH com NaOH 1N
- Completar o volume
- Distribuir 2 mL em tubos com 12x100 mm com tampa de rosca
- Autoclavar a 121°C por 20 min
- Para o Ágar-J, este meio tem a glicose substituída por 0,1% de KNO₃
- Inocular cada linhagem em 3 tubos com o auxílio de agulha contendo cultura vinda de crescimento de 24 h a 48 h em Ágar Simples ou Ágar -J, se for o caso
- Incubar por 3 dias e 7 dias na temperatura de 33°C
- Pesquisar o nitrito com 3 dias, juntando ao tubo quatro gotas de: (1) Solução de Ácido sulfanílico (Ácido sulfanílico 8 g; Ácido acético glacial 5N - 1000 mL); (2) Solução de Dimetil-alfa-naftilamina (*) - 6 mL em Ácido acético glacial 5N - 1000 mL
- O surgimento de cor vermelha ou amarela (alta concentração de nitrito) indica reação positiva. Caso contrário, testar após 7 dias de incubação
- Permanecendo negativa, a reação será ensaiada com 14 dias. Permanecendo negativo, adicionar de 4 mg a 5 mg de zinco em pó fino ao tubo previamente contendo os reativos anteriores
- A presença de nitrato (ausência de redução) será demonstrada pelo aparecimento de cor vermelha (nitrito não formado).
- (*) Pode-se usar alfa-naftilamina – 5 g.

2.2. MEIO DE FENILALANINA

Verificação da desaminação da fenilalanina

	g/L
Extrato de levedura	3
DL-fenilalanina	2
Na ₂ HPO ₄	1
NaCl	5
Ágar-ágar	12
Água destilada ou equivalente	qsp

pH 7,3

- Dissolver os componentes em 80% de água morna, ajustar o pH com NaOH 1N, completar o volume e adicionar o Ágar-ágar
- Fundir, resfriar até aproximadamente 45°C e distribuir por tubos de ensaio com tampa de rosca afrouxadas
- Autoclavar a 121°C durante 20 min
- Inclinar até o resfriamento e apertar as roscas
- Para *Bacillus* de crescimento lento, como alguns entomopatogênicos, usar Ágar-J com 2 g de L-fenilalanina substituindo a glicose
- Inocular cada linhagem bacteriana em duplicata, incubar à temperatura de 33°C
- Após 7 dias, examinar um tubo adicionando-lhe de 4 a 5 gotas de FeCl₃ em solução aquosa a 10%
- Caso o meio com o crescimento bacteriano venha adquirir a cor verde, isto significa que ocorreu a formação de ácido fenilpirúvico e a reação é positiva. Não ocorrendo, deixar o segundo tubo incubando até o 21º dia. Adicionar o reativo FeCl₃ e observar o resultado.

2.3. MEIO DE GELATINA

Verificação da liquefação da gelatina

	g/L
Peptona de carne	5
Extrato de carne	3
Gelatina bacteriológica (Difco)	120
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 6,9 ± 0,3	

- Dissolver a peptona de carne e o extrato de carne em 90% de água, ajustar o pH com NaOH 1N
- Completar o volume e adicionar a gelatina bacteriológica
- Fundir a 60°C e distribuir 5 mL em tubos de 15x120 mm com tampa de rosca
- Autoclavar a 121°C durante 15 min
- Resfriar
- De um cultivo em CN, crescido durante 12-18 h, transferir aseticamente 50 µL para o Meio de Gelatina, homogeneizar e incubar
- Pesquisar a hidrólise da gelatina diariamente, colocando o tubo juntamente com outro conteúdo do meio não inoculado em refrigerador (temperatura de 3°C ± 1°C), durante 30 min
- Haverá a hidrólise se, após esse tempo, o Meio de Gelatina inoculado permanecer líquido.

Observação:

- Meio de Gelatina não inoculado e conservado em refrigerador deverá permanecer sempre sólido.

2.4. MEIO PARA CARBOIDRATOS

Base para verificação da produção de ácidos a partir de carboidratos

	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1
KCl	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Extrato de levedura	0,2
Púrpura de bromocresol	0,006
Água destilada ou equivalente	qsp
pH	7,0

- Dissolver os componentes em 80% da água, ajustar o pH com NaOH 1N
- Adicionar 15 mL de solução de Púrpura de bromocresol a 0,04% para cada litro de meio básico
- Completar o volume e distribuir 100 mL em balões
- Autoclavar a 121°C durante 20 min.

As soluções dos carboidratos são preparadas separadamente e na concentração de 20%, sendo autoclavadas a 121°C durante 20 min. Dissacarídeos são esterilizados por filtração através de filtros de membrana ou Seitz. A adição das soluções de carboidratos ao meio base é feita assepticamente na proporção de 5 mL para cada 100 mL. Misturar e distribuir assepticamente 5 mL em tubos de 15x120 mm com tampa de rosca.

No caso da glicose, este açúcar é dissolvido quando do preparo do meio básico. Distribuir em tubos de 15x120 mm com tampa de rosca, previamente contendo um tubinho de Durham. Esterilizar sob vapor flutuante por 30 min. Inocular os tubos com alça, contendo crescimento de 1 dia em CN. Incubar à temperatura de 30°C a 33°C por até 14 dias. A formação de ácidos (reação positiva) é observada pela mudança de cor do meio, do violeta para o amarelo. Verificar se no tubo da glicose existe gás retido no tubo de Durham. O teste para os *Bacillus fastidiosos* (*P. larvae*, *P. popilliae* e *P. lentimorbus*) é feito no meio Caldo-J adicionado de 0,5% de carboidratos mas isento de púrpura de bromocresol, a qual é impediante na concentração empregada quando no meio básico. Pesquisar a acidez do meio tirando uma gota e depositando-a em placa-de-toque contendo uma gota do indicador a 0,04% em solução alcoólica, e procurar a mudança de cor. A cor amarela indica a presença de ácidos.

2.5. ÁGAR ESCULINA¹⁶

Verificação da hidrólise de esculina

	g/L
Ágar Infusão de Carne	40*
Esculina	10
Citrato férrico	5
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,2-7,4	

- ⇒ Dissolver os componentes em 500 mL da água e completar o volume
- ⇒ Colocar o Ágar Infusão por último
- ⇒ Aquecer para fundir, ajustar o pH, dispensar a solução em porções de 3 mL em tubos de ensaio de 13 mm com tampa de rosca e autoclavar a 121°C por 15 min
- ⇒ Incliná-lo e deixá-lo solidificar.

Observação:

- A hidrólise da esculina é pesquisada por até 2 dias quando o inóculo incubado a 33°C produzir, ao longo da linha de semeadura, crescimento que origina um precipitado negro. A falta de precipitado ou somente mudança de cor revela ausência de hidrólise.

2.6. REAÇÃO DA GEMA-DE-OVO

Meio básico:

	g/L
Tripticase ou Triptona	10
Na ₂ HPO ₄	5
KH ₂ PO ₄	1
NaCl	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
Glicose [D(+)] Dextrose]	2
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,6	

16. Balows, A [Editores: Hansler Jr. W.J.; Herrman, K.L., Isenberg, H.D and Shadomy, H.J.]. 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, American Society for Microbiology, Washington, DC.

* Ágar infusão de carne pode ser substituído por Ágar Nutriente (Difco).

- ⇒ Dissolver os componentes em 80% da água, ajustar o pH com NaOH 1N se necessário, completar o volume
 - ⇒ Autoclavar a 121°C durante 20 min
 - ⇒ Resfriar
 - ⇒ Adicionar 15 mL de gema de ovo homogeneizada, aseticamente. Homogeneizar, deixar em refrigerador durante uma noite
 - ⇒ Distribuir 5 mL do sobrenadante em tubos estéreis de 15X20 mm com tampa de rosca
 - ⇒ Inocular uma alça com cultivo bacteriano em Caldo Nutriente-CN de 12-18 h
 - ⇒ Incubar a temperatura de 30°C a 33°C e ler diariamente durante 7 dias.
- A reação da gema de ovo será positiva se no tubo com a gema ocorrer a formação de flocos abundantes que se acumulam na superfície do caldo. No tubo contendo CN deverá existir somente o crescimento bacteriano.

Observação:

- Para os *Bacillus* fastidiosos e gêneros correlatos, patogênicos para insetos, o meio básico deverá ser substituído pelo Caldo-J.

2.7. TESTE DA OXIDASE

Verificação da produção da enzima citocromo oxidase

- ⇒ Fazer inóculo puntiforme na superfície do meio Ágar Nutriente contido em placa de Petri
- ⇒ Incubar por 24-48 h
- ⇒ Adicionar sobre as colônias algumas gotas de solução a 1% de oxalato de p-aminodimetilanilina e solução a 1% de α -naftol em etanol absoluto
- ⇒ O resultado será oxidase positivo quando surgir uma coloração azul intensa, dentro de 2-4 min.

Observações:

- Preparar a solução de oxalato de p-aminodimetilanilina momentos antes do uso.
- Para as bactérias de crescimento lento e nutrição fastidiosa como o *P. larvae*, *P. popilliae* e o *P. lentimorbus*, o meio de cultura usado é o Ágar-J. O inóculo provém de um crescimento em Caldo-J.

2.8. PROVA SIMULTÂNEA DA AMILÓLISE E PROTEÓLISE ¹⁷

	g/L
Peptona de carne	5
Extrato de Carne	3
Amido solúvel	5
Leite em pó desnatado	50
Ágar-ágar	15
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,2-7,4	

- ☞ Reconstituir o leite em 200 mL de água destilada
- ☞ Autoclavar a 115°C durante 20 min
- ☞ Dissolver a peptona, o extrato de carne e o amido com 80% da água a ser utilizada
- ☞ Ajustar o pH com NaOH 1N
- ☞ Adicionar o Ágar-ágar e autoclavar a 121°C durante 15 min
- ☞ Resfriar a cerca de 60°C e adicionar assepticamente os 200 mL de leite estéril
- ☞ Homogeneizar e distribuir por placas de Petri
- ☞ Guardar as placas em estufa a temperatura de 33°C por uma noite para a secagem da superfície
- ☞ Inocular cada linhagem de *Bacillus* ou gêneros correlatos num ponto da superfície da placa
- ☞ Incubar à temperatura de 30°C a 33°C durante 48 h
- ☞ A leitura da proteólise é direta, observando-se os halos transparentes formados ao redor das colônias
- ☞ Ler a amilólise colocando a superfície do meio de cultura em contato com vapores de I₂ que se originam de uma solução de Lugol forte aquecida a 60°C
- ☞ A amilólise é positiva se ao redor da colônia não houver a formação de cor roxa (halo incolor).

2.9. MEIOS DE CULTURA CITADOS NA LITERATURA DESTINADOS À CONTAGEM BACTERIANA E VERIFICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE LIPÓLISE

2.9.1. Segundo Kouker, G. & Jaeger K.-E - APPL. Environ. Microbiol. 53 (1) [211-213] 1987, com ligeiras modificações

	g/L
Caldo Nutriente	8
NaCl	4
Ágar-ágar	10
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,0	

17. Usar o leite em pó desnatado Bacto Skin Milk (Difco). Alternativamente, leite em pó desnatado como das marcas Itambé e Molico poderá ser empregado; Técnica desenvolvida no Laboratório de Fisiologia Bacteriana, do Instituto Oswaldo Cruz, 1979.

- Autoclavar por 121°C durante 15 min. Manter na temperatura de 60°C
- Adicionar 2,5% p/v de azeite de oliva extra-virgem
- Juntar 1% de Rodamina “B” (Aldrich-25242-5 ou Sigma-R6626) solução aquosa a 0,001% seguida de agitação vigorosa e submeter a misturador para emulsificar durante 1 min
- Deixar em repouso a 60°C para reduzir a espuma
- Distribuir em placas de Petri (ficarão opacas e cor de rosa)
- Secar a superfície (estufa) a 33°C até 37°C
- Inocular por esgotamento
- Incubar entre 33°C até 35°C durante 48 h, no mínimo
- Examinar sob luz UV a 350 nm
- Após 16 h de incubação, as colônias começam a exibir fluorescência de cor laranja (halos), mostrando então as produtoras de lipase
- Podem-se utilizar outros indicadores: Nile-Blue Sulfate ou Victoria Blue B
- O azeite é esterilizado através de uma coluna “neutral alumina” (óxido de alumínio) em uma mistura de solvente de éter e éter de petróleo e o corante indicador por filtração. No atual caso, autoclavar a 121°C durante 30 min
- Controle positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*
- Controle negativo: *Escherichia coli*

2.9.2. Segundo Alane Beatriz Vermelho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, 2012)

	(%)
Azeite de oliva extra-virgem	2
Extrato de levedura	0,1
NaCl	0,85
Ágar-ágar	2
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,0	

- Juntar os ingredientes, exceto o azeite e autoclavar por 121°C durante 20 min
- Recomenda-se autoclavar o meio juntamente com um magneto
- Depois do ágar fundido, deixar o meio em agitação vigorosa com o magneto e adicionar o azeite aos poucos
- Deixar agitando até o momento de verter em placas de Petri. Verter e aguardar a solidificação. Conservar em refrigerador

2.9.3. Segundo Leon Rabinovitch – adaptado de Kouker, G.&Jaeger K. - E. – Appl. Environ. Microbiol. 53 (1) [211-213] 1987

	g/L ou mL/L
Ágar Nutriente (Oxoid)	28
Azeite de Oliva Extra-Virgem	18,71
Goma Arábica em pó	10
Água destilada ou equivalente	qsp

pH 7,0

- Autoclavar por 121°C durante 15 min e manter a 60°C
- Adicionar 1% de Rodamina “B” (Aldrich-25242-5 ou Sigma-R6626) solução aquosa a 0,001% seguida de agitação vigorosa e submeter a misturador para emulsificar durante 1 min; se a solução aquosa de Rodamina “B” (Aldrich-25242-5 ou Sigma-R6626) for a 1mg / 0,1 mL usar 0,1 mL%
- A partir desta etapa o experimento será semelhante ao de Kouker, G.&Jaeger K. - E. (1987), citado acima

CAPÍTULO 3. PROVAS FISIOLÓGICAS

Tabela 5 - Faixas de temperaturas para a determinação ótima de crescimento¹⁸

<i>Bacillus</i>		Temperatura °C Superior	Temperatura °C Inferior
<i>Bacillus subtilis</i>		10	50
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Atual <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	50	65
<i>Bacillus acaulophilus</i>		30	40
<i>Bacillus alvei</i>	Atual <i>Paenibacillus alvei</i>	30	40
<i>Bacillus anthracis</i>		30	40
<i>Bacillus azotoformans</i>		30	40
<i>Bacillus badius</i>		30	50
<i>Bacillus brevis</i>	Atual <i>Brevibacillus brevis</i>	30	55
<i>Bacillus cereus</i>		10	40
<i>Bacillus circulans</i>		10	40
<i>Bacillus coagulans</i>		30	55
<i>Bacillus fastidiosus</i>		10	40
<i>Bacillus firmus</i>		10	40
<i>Bacillus globisporus</i>		5	30
<i>Bacillus insolitus</i>		5	10
<i>Bacillus larvae</i>	Atual <i>Paenibacillus larvae</i>	30	40
<i>Bacillus laterosporus</i>	Atual <i>Brevibacillus laterosporus</i>	15	50
<i>Bacillus lentimorbis</i>	Atual <i>Paenibacillus lentimorbis</i>	20	35
<i>Bacillus lentus</i>		30	30
<i>Bacillus licheniformis</i>		30	55
<i>Bacillus macerans</i>	Atual <i>Paenibacillus macerans</i>	10	50
<i>Bacillus macquariensis</i>	Atual <i>Paenibacillus macquariensis</i>	5	10
<i>Bacillus marinus</i>		5	30
<i>Bacillus megaterium</i>		5	40
<i>Bacillus mycoides</i>		5	40
<i>Bacillus pantothenicus</i>	Atual <i>Virgibacillus pantothenicus</i>	30	50
<i>Bacillus pasteurii</i>		30	40
<i>Bacillus polymyxa</i>	Atual <i>Paenibacillus polymyxa</i>	5	40
<i>Bacillus popilliae</i>	Atual <i>Paenibacillus popilliae</i>	20	35
<i>Bacillus pumilus</i>		5	50
<i>Bacillus schlegelii</i>		50	65
<i>Bacillus sphaericus</i>	Atual <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	10	40
<i>Bacillus stearothermophilus</i>		40	65
<i>Bacillus thuringiensis</i>		10	40

18. Na década de 1990 surgiram na literatura novos gêneros originários de estudos filogenéticos intra-específicos a partir de espécies algumas das quais integraram por muitos anos o Gênero *Bacillus*. Esses estudos se basearam na comparação da sequência do RNA ribossomal 16S. Os novos gêneros propostos são: *Paenibacillus* (Ash et al., 1991a; Ash, Priest & Collins, 1993); *Alicyclobacillus* (Wisotzkey et al., 1992); *Halobacillus* (Spring et al., 1996); *Brevibacillus* e *Aneurinibacillus* (Shida et al., 1996); *Virgibacillus* (Heyndrickx et al., 1998); *Gracilibacillus* e *Salibacillus* (Waino et al., 1999). *Amphibacillus* (Niimura et al., 1963) e *Sporolactobacillus* (Kitahara & Suzuki; 1963) eram gêneros descritos anteriormente

3.1. VERIFICAÇÃO DE CRESCIMENTO EM ÁGAR ANAERÓBICO

	g/L
Tripticase	20
NaCl	5
Ágar-ágar	15
Tioglicolato de sódio	2
Formaldeído sulfoxilato de sódio	1
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 7,2	

- Dissolver os componentes em 80% de água morna, ajustar o pH com NaOH 1N, completar o volume e adicionar o Ágar-ágar
- Fundir, resfriar até aproximadamente 45°C e distribuir 5 mL a 6 mL em tubos de 15x120 mm com tampa de rosca afrouxada
- Autoclavar a 121°C durante 20 min
- Deixar os tubos em pé e apertar as tampas depois de frios
- Inocular, por picada, com uma agulha recoberta com crescimento de 24 h em Caldo Nutriente, sem atingir o fundo do tubo
- Incubar a temperatura de 30°C a 33°C, ou 45°C para termofílicos, procurar crescimento superficial e na picada (aeróbico) e a 1cm abaixo da superfície (anaeróbico)
- Com temperaturas inferiores a 45°C, o tempo de incubação é de até 7 dias
- Com temperaturas de 45°C ou mais elevadas, o tempo de incubação é de até 3 dias. No caso dos *Bacillus* fastidiosos patogênicos para insetos, o tempo de incubação é de até 14 dias.

3.2. VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

- A partir de um crescimento em Caldo Nutriente ou Caldo-J incubado durante 12 a 18 h, transferir o inóculo com o auxílio de alça bacteriológica para o meio AES inclinado em tubos de 15x150 mm com tampas de rosca
- Deixar as tampas levemente frouxas
- Incubar sob imersão, em banho-maria (não deixando a água atingir a tampa), conforme as condições a seguir:

Temperatura °C	Tempo (dias)
60	3
55	3
50	5
45	5
40	5
35	5
30	5
25	14
20	14
15	21
10	21
5	21

O crescimento é observado com o aparecimento de colônias.

3.3. VERIFICAÇÃO DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO

De um cultivo de 18 h em meio NYSM líquido, transferir uma alça de 3 mm de diâmetro cheia, ou 5 µL, para outros tubos de ensaio (15x120 mm) com tampas de rosca encerrando-se 5 mL de meio NYSM líquido, contendo cada tubo as seguintes concentrações de NaCl: 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% e 15%. Incubar. Verificar o crescimento bacteriano diariamente por até 5 dias.

CAPÍTULO 4. PROVAS CITOMORFOLÓGICAS

Observação da morfologia celular obtida nas seguintes condições:

Objetiva apochromat - HI 100/1,32

Ocular - pK 12,5

Colorações

Notar as seguintes características:

Comprimento: Bastão curto ou bastão longo

Largura: Estreito ou largo

Cadeia: Curta ou longa

Células: Isoladas e/ou aos pares

4.1. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM MODIFICADO (19,20)

Cristal Violeta

Solução A	g/mL
Cristal violeta (90% de corante)	2
Álcool etílico (mínimo 95% v/v) pró análise	20
Solução B	g/mL
Oxalato de amônio (pró análise)	0,8
Água destilada ou equivalente	80

- Adicione a solução A à solução B
- Misture bem e passe para frasco âmbar dotado de tampa de rosca. Armazenar por 24 h e filtrar através de papel de filtro tipo xarope.
- Preservar no mesmo frasco em local fresco.

Lugol

	g/mL
Iodo metalóide	1
Iodeto de potássio (pró análise)	2
Água destilada ou equivalente	300

- Dissolver o iodeto na água e acrescentar o iodo aos poucos com agitação constante
- Preservar em frasco âmbar dotado de tampa de rosca
- Guardar em local fresco.

Fucsina carbólica de Ziehl

Solução A	g/L
Fucsina básica (mínimo de 90%)	3
Álcool etílico (mínimo 95% v/v) pró análise	100

Solução B	g/L
Fenol (para análise)	50
Água destilada ou equivalente	950

- Misturar A e B
- Momentos antes do uso, diluir 1:10 com água destilada
- O corante diluído não se preserva bem mesmo no refrigerador
- Desprezar após 2 meses

Alternativamente, a coloração de fundo pode ser feita com Safranina O, conforme fórmula abaixo.

Solução estoque de contra-corante de Hucker

	g/L
Safranina O (certificada)	25
Álcool etílico (mínimo 95%, v/v) pro análise	qsp

Para uso, adicione 10 mL desta solução estoque a 90 mL de água destilada. Armazenar em frasco âmbar dotado de tampa de rosca.

Procedimento de coloração

Fixar o esfregaço em lâmina de microscópio usando calor suave e passando-a rapidamente através da chama do bico de Bunsen (3 a 4 vezes). Mergulhar a lâmina na mistura das soluções (A) e (B) por 1 min. Lavar rapidamente em água corrente (por não mais que 5 s). Cobrir com a solução de Lugol por 1 min e lavar em água corrente, 5 s. Descorar com Álcool etílico a 95% (v/v) por aproximadamente 10 s (até remover todo o excesso de corante). Lavar com água rapidamente, escorrer e aplicar a solução de Fucsina Carbólica de Ziehl (ou de Safranina O) por 1 min. Tornar a lavar e deixar secar ao ar.

19. Hucker, G.J. 1922. Comparison of various methods of Gram staining. (Preliminary Report), Alestr. Bacteriol., 6,2. and H.J.Coun. 1993. Methods of Gram staining. NY State Agr. Expt. Sta Tech. Bull. 129.;

20. Food and Drug Administration Bureau of Foods-DM. 1976 Appendix B, Page B-14 AOAC-US- WASHINGTON.

4.2. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ESPOROS

4.2.1. Método a frio de Bartholomew & Mittwer ^(21, 22, 23)

Solução Corante	g/L
Verde Malaquita	50
Água destilada ou equivalente	qsp
Contra-corante	g/L
Safranina O	2,5
Álcool etílico (mínimo 95% v/v) pró análise	qsp

- ⇒ Dissolver os corantes
- ⇒ Guardar as soluções em frascos âmbar dotados de tampa de rosca e rotular
- ⇒ Fazer esfregaço em lâmina de microscópio. Fixar na chama do bico de Bunsen
- ⇒ Mergulhar a lâmina fixada no corante Verde Malaquita por 45 min. Rinçar por 10 s em água corrente. Colocar a solução contra-corante de Safranina a 0,25% por 30 s
- ⇒ Lavar com água corrente e secar ao ar.

4.3. COLORAÇÃO PARA OBSERVAÇÃO DA FORMA E ARRANJO DE FLAGELOS

4.3.1. Preparação da suspensão bacteriana

Cultivar a bactéria em Ágar Nutriente preparado com 0,8% de Ágar-ágar colocado em tubos de 15 mm x 120mm, em pé. Para *Bacillus fastidiosos* e gêneros correlatos usar meio Ágar-J, com apenas 0,8% de Ágar-ágar. Incubar por 9-12 h a 33-35°C. Centrifugar o cultivo a 3000 x g por 5 min em 3 microtubos de Eppendorf (1,5 mL). Lavar 2 vezes com 1 mL de água destilada estéril contendo 10 µL de Formaldeído a 40%. Desprezar os sobrenadantes. Trabalhar com o sedimento adicionado de 100 µL de água destilada estéril. Armazenar 2 microtubos no refrigerador como reserva (por uma semana). Este é o material flagelar para a coloração.

4.3.2. Preparação das lâminas

Usar lâminas para microscópio novas, lavadas com detergente neutro a 10%, enxaguadas com água destilada de modo a não permanecer resíduos de detergente, preservadas em Álcool etílico a 92,8°INPM. Não manusear as lâminas úmidas, usar luvas ou pinça, secar ao ar.

Balows, A [Editores: Hansler Jr. W.J.; Herrman, K.L., Isenberg, H.D and Shadomy, H.J.]. 1991.

Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, American Society for Microbiology, Washington, DC.

21. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, 1991, pg. 1131, By Peter Nash.

22. Manual of Microbiological Methods (by the Society of American Bacteriologists), 1957.

23. Committee on Bacteriological Technic (N.J. Pelczar, JR. Chairman); 1957, Mc Graw Hill Book Comp. Inc., New York.

4.3.3. Preparação do esfregaço

Passar a lâmina seca por alguns segundos na chama azul do bico de Bunsen, no lado que receberá o esfregaço. Em seguida, marcar linhas grossas com lápis dermatográfico, acompanhando as bordas e em forma de um “U”. No lado aberto, depositar alça cheia da suspensão bacteriana. Inclinando lentamente a lâmina de modo a fazer a mistura deslizar para a linha de cera oposta. Deixar secar ao ar e não fixar ao calor.

4.3.4. Composição e preparação do corante

Solução corante	g/mL
Cloreto de sódio (NaCl)	0,5
Ácido tânico	1,0
Acetato de pararosanilina*	0,3
Cloridrato de pararosanilina*	0,1
Álcool etílico, 95% (v/v), pró análise	33
Água destilada ou equivalente	67

(*). Para a coloração de flagelos, a mistura de pararosanilinas pode ser substituída por Fucsina básica certificada.

4.3.5. Preparação da solução corante

O método mais simples para o preparo do corante consiste em se fazer 3 soluções separadas: (1) NaCl em água destilada na concentração de 1,5%. (2) Ácido tânico em água destilada na concentração de 3,0%, e (3) os corantes em Álcool etílico a 95% (v/v), P.A. na concentração de 1,2%.

As 3 soluções são então misturadas em proporções exatamente iguais e armazenadas em frasco âmbar, com tampa de rosca, mantido em refrigerador.

Observação:

- Os sais de pararosanilina se dissolvem lentamente no Álcool etílico, sendo melhor deixar algumas horas, agitando-se a mistura frequentemente até sua completa dissolução.

4.4. Coloração de cápsula bacteriana²⁴

Comentários e Observações

Nem todos os corantes geralmente usados para cápsulas bacterianas são satisfatórios. Os corantes para flagelos descritos anteriormente em Coloração para Observação da Forma e Arranjo de Flagelos são também excelentes para visualização de cápsulas. O método de fazer esfregaços e a etapa de coloração são exatamente como os descritos para coloração de flagelos. Um contracorante é, contudo, de emprego obrigatório. Com a fucsina básica ou pararosanilina (vermelha) e o Azul de Metileno como contracorante (azul), as cápsulas são coradas em vermelho e os microrganismos em azul.

Quando os microrganismos se originam do peritônio de animal de laboratório (líquido peritoneal), as lâminas podem ser feitas diretamente com esse material. Contudo, geralmente é melhor lavar as bactérias em água destilada, ou equivalente, antes de se fazer o esfregaço. No caso de os organismos possuírem cápsula e flagelos, ambos podem ser corados ao mesmo tempo. Aqui, tanto cápsula como flagelo assumem a cor do corante, enquanto o microrganismo cora-se com o contracorante. O fato de o flagelo e cápsulas corarem-se com o mesmo corante não indica, necessariamente, que ambos sejam da mesma natureza química. Como o álcool evapora, o corante precipita e é incorporado pelos flagelos e cápsulas ou outro material que possa se encontrar nessa mesma lâmina. *Bacillus anthracis* tem sido corado com sucesso por esse procedimento.

Solução de Contracorante

	g/100 mL
Azul de metileno ²⁵	0,1
Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ PM= 381,27)	1
Água destilada ou equivalente	qsp

☞ Dissolver o Borax, o Azul de Metileno e filtrar por papel Whatmann n°4 em funil de vidro. Guardar em frasco âmbar com tampa de rosca. Rotular como solução de Azul de Metileno Contracorante.

Observação:

- A fucsina carbólica (vide Método de Coloração de Gram Modificado) diluída a 1:10 com água destilada e aplicada durante 5-10 min produz um bom contracorante, caso em que o flagelo fica azul e cápsula avermelhada.

24. Baseado em: Leifson, E. 1930. A Method of Staining Bacterial Flagella and Capsules Together with a Study of the Origin of Flagella. J. Bacteriol., 203-211.

25. Azul de metileno (Methylene blue, C.I. Azul básico 9).

ANEXO 1 – ÁGUA REAGENTE E SOLVENTE NO LABORATÓRIO DE PESQUISA MICROBIOLÓGICA

A água é um reagente e solvente utilizado na maioria dos laboratórios de cultura, alimentação de equipamentos, lavagens, sanitização de bancadas, pisos e outros^(2,6). Entretanto, se não for feito um correto monitoramento da qualidade da água poderão ocorrer problemas que afetam diretamente as atividades laboratoriais. Por isso, deve-se seguir um padrão de controle na pesquisa científica, tecnológica e de análises clínicas. São diversas as suas aplicações tais como a reconstituição de reagentes, preparo de soluções padrões, soluções-tampões e diluições, além de confecção de meios de qualidade rigorosa. O abastecimento urbano de água potável fornece um líquido que contém misturas de moléculas orgânicas, íons inorgânicos, partículas sólidas de tamanhos diversos, coloides, gases, bactérias, fungos, eventualmente protozoários, e produtos desses microrganismos. Estes podem alterar os resultados dos testes e ensaios laboratoriais provocando eventuais erros e falhas mecânicas em equipamentos analíticos^(3,4). Para remover essas impurezas, é necessário recorrer a uma combinação de tecnologias de purificação. Existem várias organizações nacionais e internacionais que especificam normas sobre a água reagente e solvente, a fim de minimizar sua interferência nos ensaios laboratoriais. Entre elas estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a American Society for Testing and Materials (ASTM), o Standard Methods for Analysis of Water and Wastewaters, United States Pharmacopeia (USP)^(5,7-9), American Chemical Society (ACS), British Standards Institute (BSI), International Organization for Standardization (ISO)⁽⁹⁾, College of American Pathologists (CAP)⁽¹⁰⁾, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽⁶⁾ e Organização Mundial da Saúde (OMS)⁽¹⁰⁾. Essas determinam os tipos de águas, métodos de obtenção e controles necessários para a utilização correta, auxiliando assim as equipes que atuam nos laboratórios⁽¹¹⁾. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 302:2005 da ANVISA preconiza que o laboratório clínico, em sua fase analítica, deva definir o grau de pureza da água reagente utilizada em suas análises, a forma de obtenção e o controle da qualidade⁽¹¹⁾.

Os padrões estabelecidos pelo CLSI⁽⁶⁾ são os mais comumente empregados em nosso país. O documento C3-A4 – *Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory* – define os parâmetros utilizados para cada tipo de água e, de acordo com a necessidade do uso, um desses tipos é escolhido. Assim, as águas (CLSI) foram classificadas em: *Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW)*, *Special Reagent Water (SRW)* e *Instrumental Feed Water (IFW)*. As especificações do CLSI em relação à contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC/ml) são similares para os tipos CLRW e SRW, isto é, devem ser inferiores a 10 para ambas. Quanto ao material particulado, em ambos os casos, o filtro ao final da purificação deverá

ter removido partículas com diâmetros superiores a 0,22 µm. Para o carbono orgânico total, os níveis aceitos devem ser inferiores a 500 g/g na CLRW e inferiores a 50 ng/g na SRW.

O CLSI no documento C3-A4 define como classificações adicionais:

Água para autoclave e lavagem

Trata-se de água purificada de modo a conter baixos níveis de compostos orgânicos, inorgânicos e materiais particulados que, do contrário, poderão contaminar soluções e meios de cultura nos procedimentos de esterilização por autoclave;

Água fornecida em “kits” para soluções em procedimentos específicos

Como diluente ou como reagente, deve ser empregada apenas em “kits”, e nunca em outra aplicação. Esse tipo de água não substitui as águas dos tipos CLRW ou SRW;

Água purificada comercial, fornecida envasada

O usuário deve se precaver quanto à qualidade da água a ser empregada em função do tempo de sua estocagem, sendo necessário validar os parâmetros da água CLRW ao longo do tempo de utilização. Cada novo lote de água envasada deve ser validado antes de seu uso. A CLRW substituiu as antigas águas dos tipos I e II^(5,6), e é utilizada no laboratório de análises clínicas em diversas funções como reconstituição de reagentes, meios de cultura desidratados, padrões, calibradores e brancos de reações, lavagem de cubetas, sondas e outros instrumentos. Essa água é isenta de materiais orgânicos e inorgânicos, partículas e coloides, além de bactérias e seus subprodutos^(5,6). Já a SRW é de qualidade livre de nucleases (Dnases e Rnases) e é a recomendada para emprego em técnicas moleculares^(5,6). Há também a IFW, que é usada para banhos, enxagues internos de maquinários, diluições e outras funções utilizadas nos analisadores automatizados^(5,6). Vale ressaltar que a água reagente não deve ser estocada; ela deve ser usada no momento em que é produzida, em virtude da contaminação por gases do ambiente e crescimento microbiano^(6,12).

No monitoramento de águas proposto pelo CLSI observam-se:

- 1- Verificação da integridade dos componentes do sistema de purificação da água.
- 2- Comprovação de que as especificações estão sendo continuamente cumpridas e seus registros estão sendo efetuados para a verificação da resistividade, contagem de UFC/ml e quantificação de compostos orgânicos^(5,6).

Os processos de purificação são:

Filtração

Processo de separação de partículas contaminantes presentes na água por meio da utilização de um material poroso, como filtros de carvão ativado ou de celulose^(5, 6, 13, 16, 17);

Destilação

É usada para separar misturas homogêneas do tipo sólido-líquido, nas quais os componentes têm pontos de ebulição diferentes. O vapor da água aquecida e condensado, coletado e armazenado, removendo grande parte dos contaminantes^(6,14,17);

Desinfecção por sistema ultravioleta (Uv)

A água circula num reator de esterilização. Em contato com a luz UV (na faixa de 250 nm a 270 nm) os microrganismos são inativados, resultado do dano fotoquímico ao ácido nucléico. A localização da lâmpada de UV deve ser anterior à etapa de troca iônica^(6,14,17);

Deionização

É utilizada para remoção de substâncias inorgânicas, empregando-se colunas com resinas carregadas eletricamente que permitem a troca seletiva de íons por compostos inorgânicos dissolvidos na água^(5,6,17,18);

Eletrodeionização

É um processo contínuo, em que a água passa em canais, migrando para o canal de eletrodo, seguindo através de membranas permeáveis a ânions e cátions (canais de purificação) e, por fim, pelo canal de concentração.

O campo elétrico criado faz com que os íons removidos transitem por canais em que ficam concentrados, enquanto o produto transita por outro canal e é estocado. Para evitar a precipitação de carbonato de cálcio ou magnésio, existem partículas de carvão ativado entre as resinas de troca iônica que são continuamente regeneradas pela corrente elétrica^(5,6,15,17);

Microfiltração e ultrafiltração

A membrana que é colocada na saída do sistema de purificação não permite que quaisquer partículas acima de 0,22 µm a atravessem, promovendo uma filtração esterilizante, como é o caso da microfiltração. Mais recentemente, a ultrafiltração foi proposta como uma forma de eliminar outros contaminantes não eliminados pela microfiltração pois os poros do filtro são menores, variando de 25 kDa a 3 kDa^(5,6,17);

Osmose reversa

É o processo de passagem de água através de uma membrana semipermeável, em um sistema de alta pressão, que força sua passagem pela membrana, retendo partículas, compostos orgânicos e bactérias^(6,17,18).

Controle de qualidade da água reagente

A água reagente deve obedecer a um padrão de controle de qualidade rigoroso.

Determinação de resistividade e condutividade

São úteis para mensurar a quantidade de contaminantes iônicos presentes na água, porque determinam indiretamente os sólidos totais dissolvidos. As medidas da resistividade e a condutividade de uma amostra de água reagentes devem ser feitas diariamente, conforme descrito nas normas CLSI^(6,15).

Controle microbiológico

A água de alimentação pode formar biofilmes, que interferem nos resultados de exames laboratoriais e degradam equipamentos pela biocorrosão. O biofilme é fonte de endotoxinas e polissacarídeos, gerando a contaminação e a perda da pressão da água. São realizados por meio da técnica de contagem de bactérias heterotróficas, em que o valor obtido é uma aproximação do número de microrganismos viáveis presente no sistema de purificação. As metodologias utilizadas são: técnicas de espalhamento em meio de cultura sólido contido em placa de Petri, que permite crescimento bacteriano para contagem; da membrana filtrante, que também permite crescimento bacteriano para contagem de colônias; e, por microscopia de fluorescência, a qual permite a visualização de células bacterianas tornadas fluorescentes. Tal controle microbiológico é feito semanalmente ^(5,6,12,20).

Endotoxinas

Constituem o maior componente lipídico da membrana externa de bactérias Gram-negativas que as liberam no meio circundante durante sua multiplicação, ou morte. As endotoxinas são adsorvidas de modo variado à maioria das superfícies, incluindo o carvão ativado e as resinas. A detecção e/ou a quantificação dos níveis de endotoxinas pode ser feita por teste do coágulo, turbidimetria ou técnica cromogênica ^(6,21,23).

Tabela 6: Vantagens e desvantagens dos métodos de purificação

Método	Vantagens	Desvantagens
Filtração	Remoção de cloro, partículas e matéria orgânica	Produto sem eliminação de íons e bactérias
Destilação	Remove grande porcentagem de todos os tipos de contaminantes	Alto custo e consumo de energia
Ultravioleta	Baixo uso de energia	Danifica o mecanismo de replicação, sem remoção dos microrganismos
Deionização	Eficiência na substituição dos compostos inorgânicos	Saturação rápida das resinas de troca iônica
Eletrodeionização	Regeneração das resinas por corrente elétrica	Não remoção de partículas e matéria orgânica
Micro/ultrafiltração	Filtração esterilizante	Morte dos microrganismos retidos por trás do filtro
Osmose reversa	Remove grande percentual de todos os tipos de contaminantes	Membranas sujeitas a incrustações e obstruções a longo prazo

Citações do ANEXO 1

1. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, American National Standards, Inc. AAMI standard and recommended practices. Arlington, Dialysis, v. 3, 1993.
2. Standard Specification for Reagents Water. ASTM document D 1193-91. 1991.
3. Basques, F. W. A. A água como reagente. Labtest, 2010. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/publicacoes/publicacoeslabtest>>. Acesso em: 7 maio 2011.
4. Basu, S.; Pal, A.; Desai, P. K. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. Indian J Med Microbiol, 2005. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/text.asp?2005/23/3/159/16586>>. Acesso em: 18 jan. 2011.
5. Bôle, J.; Mabic, S. Utilizing ultrafiltration to remove alkaline phosphatase from clinical analyzer water. Clin Chem Lab Med, v. 44, n. 5, p. 603-8, 2006.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre regulamentação técnica para funcionamento de laboratórios clínicos. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC no 302, 2005.
7. Burlin, C. L.; Albertão, F. Qualidade no laboratório. Rev Meio Filtrante, ed. 26, ano VI, 2007. Disponível em: <http://www.meiofiltrante.com.br/materias_ver.asp?ac=detalhe&id=296&revista=n26>. Acesso em: 12 jan. 2011.
8. Caraway, W. T. Chlorine in distilled water as a source of laboratory error. Clin Chem, v. 4, n. 6, 1958.
9. Clementino, M. R. A.; Neto, P. J. R.; Alencar, J. R. B. Carbono orgânico total: metodologia analítica e aplicações para indústria farmacêutica. Rev Bras Farm, v. 89, n. 1, p. 74-80, 2008.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI . Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory. Approved guideline. 4th ed. CLSI document C3-A4 [ISBN 1-56238-610-7], 2006.
11. Commission on Laboratory Inspection and Accreditation. Reagent water specification. Chicago, College of American Pathologists, 1985.
12. Laboratory Water Purification. Labconco Corporation. Disponível em: <<http://www.expotechusa.com/cata>>
13. Long, J.; Mabic, S. The impact of water quality on IVD testing. In vitro Diagnostic Technology, 2009. Disponível em: <<http://www.ivdtechnology.com/article/impact-water-quality-ivd-testing>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

14. Long, J.; Mabic, S. Water quality in patient testing. *Clinical Lab Prod*, 2007. Disponível em: <http://www.clpmag.com/issues/articles/2007-04_08.asp>. Acesso em: 19 jan. 2011.
15. Lopes, H. J. J. Garantia e controle da qualidade no laboratório clínico, 2003. Disponível em: <http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes/Garantia_e_Controlo_da_Qualidade_no_Laboratorio_Clinico.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.
16. Mabic, S. Maintaining water quality in clinical chemistry. *Advance for Medical Laboratory Professionals*, v. 15, n. 8, 2007.
17. MABIC, S. Water for clinical chemistry. Application note, 2006.
18. Mabic, S.; Kano, I. Impact of purified water quality on molecular biology experiments. *Clin Chem Lab Med*, v. 41, n. 4, p. 486-91, 2003.
19. McFeters, G. A. et al. Distribution of bacteria within operating laboratory water purification
20. Millipore Corporation. Pure water for biomedical laboratories. *Water Purification*, 2009.
21. Millipore Corporation. Water purification. Reference guide, 2008.
22. Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ :Educação Continuada. Água reagente no laboratório clínico. Disponível em: <http://www.pncq.org.br/participantes/atualizacao_baixo_001.asp>. Acesso em: 7 maio 2011.
23. Programa de Acreditação de Laboratório Clínico. Norma PALC, 2010. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320101108101701.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2011.
24. Purification Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 89, n. 5, p. 1410-5, 1993.
25. Santos, D. F. F. Tecnologia de tratamento de água. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1989.
26. Silva, C. H. P. M. et al. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. *Rev Bras de Análises Clínicas*, v. 38, n. 4, p. 243-53, 2006.
27. Stewart, B. M. The production of high- purity water in the clinical laboratory. *CE Update Water III. Lab Medicine*, v. 31, n. 11, p.605-11, 2000.
28. Whitehead, P. Laboratory monitoring of total organic carbon in ultrapure water. Application Note. *American Laboratory*, 2003. logs/labconco/pdf/guide_water.pdf>. Acesso em: 7 maio 2011.

ANEXO 2 - TESTE PARA VERIFICAÇÃO DE TOLERÂNCIA À PRESENÇA DE FENOL, ETANOL, XILOL E CRESÓIS²⁶

- De um cultivo em meio NYSM líquido de 24 h, transferir uma alça cheia, de 3 mm de diâmetro, ou 5 µl, para cada tubo de ensaio de 15 x 150 mm, dotado de tampa de rosca e contendo 10 mL de NYSM líquido
- Para cada um destes tubos adicionar separadamente: 40 µl e 60 µl de fenol previamente fundido (para análise, mínimo de 99% de pureza) ; 150 µl e 250 µl de etanol absoluto (para análise, mínimo de 99,5% em volume); 40 µl e 60 µl de creolina (o ingrediente ativo é o óleo de creosoto de coaltar, mínimo de 35% em volume); 100 µl e 250 µl de xilol (densidade = 0,85 - 0,87 a 20° C)
- Homogeneizar em vórtex, apertar as tampas e vedar os tubos com parafilme. Incubar durante 5 dias
- Verificar a existência de crescimento, retirando de cada tubo uma alça, esgotando-a nas paredes e semeando em placa de Petri contendo NYSM sólido
- Incubar durante 24 h
- Várias estirpes podem ser semeadas numa mesma placa
- A ausência de colônia revela a concentração letal inibidora de fenol, etanol, xilol e cresóis para a população bacteriana ensaiada.

26. Este procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz

ANEXO 3 - VERIFICAÇÃO DE CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE METAIS²⁷

Resistograma

➔ De um cultivo em NYSM líquido de 24 h, depositar 5 µl num ponto da superfície de cada uma de três placas de Petri contendo Ágar Nutriente Sólido adicionado de metais, conforme sugestões de concentrações a seguir:

Cu (CuSO ₄)	-	19,2 µg/100ml
Cd (CdCl ₂)	-	0,56 µg/100ml
Hg (HgCl ₂)	-	1,68µg/100ml
AlK(SO ₄)	-	17,55µg/100ml
Zn (ZnSO ₄)	-	13,08 µg/100ml

- ➔ Incubar durante 24 h
- ➔ Verificar a existência de crescimento; o resultado é positivo se for constatada a presença de pelo menos uma colônia bacteriana

Observações:

- Os sais de metais são dissolvidos em água deionizada, sendo as soluções preservadas em frascos de vidro neutro revestidos com papel-alumínio e conservados no refrigerador;
- Os frascos com as soluções de metais são deixados assumir a temperatura ambiente, antes do uso;
- As soluções devem ser adicionadas ao meio de cultura fundido e resfriado a cerca de 48°C -50°C

27. Este procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz

ANEXO 4 - TESTE DE TOLERÂNCIA AOS INSETICIDAS²⁸ **(p. ex., organoclorado, organofosforado)**

- De um cultivo de 18 h em meio NYSM líquido, transferir 100 µL para placas de Petri contendo meio NYSM sólido
- Espalhar de modo a cobrir toda a superfície
- Depositar aproximadamente 2 mg de cada inseticida em pontos distintos da superfície do meio, cerca de 2 cm distantes um do outro
- Incubar
- Anotar a inibição do crescimento medindo os diâmetros dos halos
- Estes são bem definidos, sendo os seus diâmetros dependentes do inseticida empregado
- Considerar como linhagem bacteriana tolerante quando o halo apresentar diâmetro menor que 10 mm.

28. Este procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz

ANEXO 5 - PROCEDIMENTOS PARA ISOLAMENTO DE *Bacillus* A PARTIR DE SOLO (29, 30)

Procedimento 1

Suspender 1 g de solo em 50 mL do meio Caldo Nutriente e aquecer à 70°C por 10 min. Semear por esgotamento na superfície de Ágar Nutriente contido em placas de Petri. Quando se incuba a 37°C por até 48 h favorece-se o crescimento de *B. subtilis* e *B. circulans*. Quando se incuba a 28°C por até 48 h, favorece-se o crescimento de *B. cereus*, *B. mycooides* e *B. subtilis*.

Procedimento 2

Suspender 1 g de solo em 50 mL do meio Caldo Nutriente e aquecer a 70°C por 10 min. Incubar à temperatura de 28°C por até 48 h. Semear por esgotamento na superfície de Ágar Nutriente contido em placa de Petri. Quando se incuba a 37°C favorece-se *B. cereus* e *B. megaterium*, ocasionalmente *B. subtilis*. Quando se incuba a 28°C, favorece-se o crescimento de *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycooides* e *B. subtilis*.

Procedimento 3

Suspender 1 g de solo em 50 mL de água destilada estéril. Incubar à temperatura de 37°C por 3 dias. Semear por esgotamento na superfície de Ágar Nutriente contido em placa de Petri. Quando se incuba a 37°C, favorece-se o crescimento de *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. circulans*, ocasionalmente *Brevibacillus brevis*, *Paenibacillus mascerans*, *Paenibacillus alvei* e *Lysinibacillus sphaericus*.

Procedimento 4

Suspender 1 g de solo em 50 mL do meio Caldo Nutriente com 3% de glicose e submeter a 65°C por 10 min. Incubar à temperatura de 28°C por 3 dias. Semear por esgotamento na superfície de Ágar Nutriente contido em placa de Petri. Quando se incuba a 28°C, favorece-se o crescimento de *Paenibacillus polymyxa*.

Procedimento 5

Suspender 1 g de solo em 50 mL do meio Caldo Nutriente contendo 20% de uréia previamente esterilizada por filtração. Incubar à temperatura de 28°C por 2 dias. Semear por esgotamento na superfície de Ágar Nutriente com 20% de uréia, contido em placa de Petri. Quando se incuba a 28°C, favorece-se o crescimento de *L. sphaericus*, *B. pasteurii* e ocasionalmente *B. lentus*.

29. "Further comparative study of nutritional requirements in the genus *Bacillus*. B.C. KNIGHT., H. PROOM. Journal of General Microbiology. Sep;4(3):xii. 4(3) 588 (1950)

30. As espécies deverão ser identificadas e caracterizadas

ANEXO 6 - DETERMINAÇÃO DA MORFOLOGIA DE ESPÉCIES DE *Bacillus*

Dimensões da célula vegetativa

- Cultivar a bactéria em meio Caldo Nutriente, em temperatura de 30°C à 33°C durante 12- 18 h
- Transferir para o meio Ágar Nutriente inclinado em tubos de rosca de tamanho 15x120 mm ou 15x150 mm. Incubar entre 30°C a 33°C durante 12 h
- Com o auxílio da ponta de uma agulha bacteriológica, retirar pequena porção do crescimento bacteriano e espalhá-lo em uma gota de salina (solução de NaCl 0,85% estéril) depositado sobre lâmina fina de microscópio desengordurada (espessura de 1 mm)
- Cobrir com lamínula desengordurada (espessura de 0,22 mm e 22 mm de lado)
- Depositar sobre a lamínula uma gota de óleo para microscópio e examinar sob contraste-de-fase com 2000 x de aumento em microscópio binocular, onde uma das oculares foi substituída por ocular micrométrica
- Medir dez larguras de diferentes células e dez comprimentos por campo
- Repetir o procedimento por 10 campos
- Determinar a média para os resultados.

Observação:

- Quando se tratar de bactérias fastidiosas patogênicas para insetos, cultivá-la nos meios Caldo-J e Ágar -J. Poderá ser necessário um tempo maior de incubação.

Aspectos do esporângio

Utilizar os procedimentos empregados para a determinação das dimensões da célula vegetativa, preparando ainda um tubo com o meio AES. Incubar por 24-72 h e examinar o crescimento diariamente. Verificar ao microscópio (2000 x) a posição do esporo na célula-mãe (esporângio) e se existe distendimento da parede celular (deformação do esporângio). Observar os esporos livres quanto à sua forma predominante. Para este último caso, proceder a um cotejo entre a quantidade de formas (elipsoidal, cilíndrica ou esférica). A descrição poderá seguir o que consta mais à frente.

ANEXO 7 - MEIO DE CULTURA PARA A OBTENÇÃO DE BIOMASSAS DE *Bacillus* E GÊNEROS CORRELATOS

	g/100mL (Reator/Dorna)
Farinha de Soja (2%)	120(*)
Extrato de Levedura	6
NaCl (**)	12
MgSO ₄ - 7H ₂ O(**)	1,8
MnSO ₄ - H ₂ O (**)	0,12
ZnSO ₄ - 7H ₂ O(**)	0,12
FeSO ₄ - 7H ₂ O(**)	0,12
CaCl ₂ (anidro) (**)	0,6
Água Destilada ou equivalente	qsp
pH final = 7,2 NaOH a 20%	
Esterilização 121°C/60 min	

	g/100mL (pré-inóculo)
Farinha de Soja (2%)	2(*)
Extrato de Levedura	0,1
NaCl (**)	0,2
MgSO ₄ - 7H ₂ O(**)	0,03
MgSO ₄ - H ₂ O (**)	0,002
ZnSO ₄ - 7H ₂ O(**)	0,002
FeSO ₄ - 7H ₂ O(**)	0,002
CaCl ₂ (anidro) (**)	0,01
Água Destilada ou equivalente	qsp
pH final = 7,2	
Esterilização 121°/ 20 min	

Observação:

- (*) Para a fermentação de *Lysinibacillus sphaericus*, utilizar farinha de soja desengordurada a 1% (10 g/L) na fórmula.
- (**) Qualidade para análise. Estudar qualidade mais econômica.

Preparo do mosto de fermentação

- ⇒ Dissolver todos os sais em 600 mL de água, adicionar o extrato de levedura e dissolvê-lo totalmente
- ⇒ Acrescentar a farinha de soja
- ⇒ Misturar vigorosamente e ajustar o pH para 7,2 em potenciômetro (peagômetro)
- ⇒ Completar o volume. Usar 6 L por cada batelada a fermentar
- ⇒ Passar para o reator (10 L de capacidade nominal) do fermentador e esterilizar

Preparo dos inóculos dos *Bacillus*

- ⇒ Dos tubos com tampas de rosca contendo o estoque de *Bacillus*, preservados em refrigerador, colher células com uma alça bacteriológica não cheia passando-as para um tubo com 9 mL de salina estéril (NaCl 0,85%), e homogeneizar por agitação
- ⇒ Inocular a suspensão por espalhamento em placa de Petri contendo Ágar Nutrinte e incubar a 33°C durante 24 h
- ⇒ Raspar o crescimento bacteriano com alça bacteriológica e passar para 100 mL do meio de cultura do pré-inóculo e incubar com agitação por 4 h a 300 rpm e 33°C.

Inoculação do reator e condições de fermentação³¹

- ⇒ Transferir o crescimento vindo do agitador assepticamente para o reator
- ⇒ Parte desse inóculo transferido é diluído em salina estéril, sequencialmente, na proporção de 1:10; 0,1 mL das 3 maiores diluições são plaqueadas em triplicata em meio de cultura (Plate Count Agar-PCA, isto é, Tryptone Glucose Yeast Agar, Difco- 0479-01-1 ou Oxoid- CM325, neste caso com adição de 0,6 g/L de Ágar-Ágar para perfazer 15 g/L) espalhando-se com a alça de Drigalski para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)
- ⇒ Os parâmetros estabelecidos experimentalmente como satisfatórios para a condução do processo em batelada (1 inóculo para cada fermentação) são:
 - a) Eixo com duas palhetas tipo turbina, distantes 10 cm entre elas
 - b) Anti-espumante à base de silicone irradiado 25 kGy (SAG-471, VWR/BDH/PROLABO®, Produto 97002.0110) usado na proporção de 10 mL/6L (5 mL:5 mL de água destilada, mistura esterilizada a 121°C durante 20 min) adicionados ao mosto juntamente com a adição do inóculo
 - c) Aeração: 8-10 vvm (volume de ar por volume de mosto)
 - d) Pressão no reator: 5 kg/cm²
 - e) Temperatura do mosto: 33° C
 - f) Tempo de fermentação: 21-24 h
 - g) Coleta de amostras de mosto para exame ao microscópio (1000-1500 x) e verificação da condição de cultura pura e aspecto da citomorfologia da célula bacteriana (busca da predominância de esporos e endósporos sobre células vegetativas), determinação do pH ao final da fermentação
 - h) Rotação do eixo: 400 rpm

A fermentação nessas condições, em geral, perdura por até 24 h, quando se observa ao microscópio pelo menos 80% de esporos livres dos *Bacillus*. Podem ocorrer fermentações com esporogênese quase total em 22-23 h, quando o pH encontra-se ao redor de 8-9. O pH então é ajustado para 7,2 com solução de HCl a 20%

Centrifugação contínua

Nestas condições, o mosto fermentado é centrifugado em centrífuga contínua do tipo De Laval (400 rpm) de modo a se obter a separação da biomassa úmida do *Bacillus*. A preservação das biomassas úmidas é realizada em prateleira de refrigerador doméstico e dentro de recipiente com capacidade de 500 mL, após sua retirada do rotor³¹

Secagem de biomassa úmida

Cada biomassa úmida contida em recipiente e preservada no frio deve ser dessecada em liofilizador. As biomassas secas voltavam para o refrigerador doméstico até o momento da formulação.

Determinação de UFC por unidade de peso de cada biomassa

Suspender 20 mg de cada biomassa seca em 3 mL de salina estéril (solução de NaCl 0,85%) seguindo-se homogeneização vigorosa. Retirar 1 mL da suspensão e diluir em 9 mL de salina estéril sequencialmente e na proporção de 1:10; 0,1 mL das três maiores diluições semear em placas de Petri, em triplicata, nos meios de cultura já referenciados para as bactérias. Calcular as UFC/mg ou g.

31. Tais procedimentos se prestam para o cultivo de levedura unicelular, desde que se empregue o meio de cultura adequado.

ANEXO 8 - COMPONENTES INICIAIS PARA FORMULAÇÃO DE PRÓTOTIPO DE PRODUTO E ENTRADAS PARA A PRODUÇÃO DE 3 LITROS DE PRODUTO

- Em recipiente plástico de 5 L de capacidade colocar 1 L de água destilada, adicionar o Sorbato de K e dissolver
- Adicionar o Ácido benzóico e misturar bem com o auxílio de mixer
- Adicionar o Nipagin M e misturar bem
- Adicionar o Nipazol M e misturar bem
- Adicionar o Glicerol e o Sorbitol e misturar bem
- Acrescentar o Amido aos poucos para não ‘empelotar’ e misturar bem
- Adicionar 10 g de cada biomassa obtida, conforme os Anexos 6 e 7. No caso de biomassa úmida, considerar o peso da água e a proporção de desidratação como sendo de 85%
- Adicionar o CMC aos poucos, batendo sempre, para não formar grumos
- Determinar o pH, de preferência com eletrodo
- Misturar bem
- Envasar e rotular
- Conservar em refrigerador até o momento dos ensaios de campo

Componentes iniciais para a formulação de protótipo do produto

Componentes (a)		g% ou mL%	g/L ou mL/L
Nipagin M	(Bherzog)	0,10	1,0
Nipazol M	(Bherzog)	0,12	1,2
Ácido benzóico PA, ACS	(Isofar)	0,15	1,5
Sorbato de K	(Bherzog)	0,5	5,0
CMC média viscosidade ^(b)	(Bherzog)	0,5	15
Glicerol	(Bherzog)	20	200
Sorbitol 70%	(Bherzog)	5	50
Amido solúvel PA	(Bherzog)	5	50
Água destilada	(LFB/IOC)	q.s.p.	q.s.p.

a) Excetuando a água empregada, todos os demais componentes da fórmula foram de qualidade superior a grau técnico

b) Carboxi Metil Celulose

ANEXO 9 - FABRICAÇÃO DO “FERMENTO LÁTICO”

Extra Programa

1. Cultura bacteriana

Lactobacillus acidophilus (Moro,1900) Holand,1920, mantida em meio de cultura de Leite Simples. Repiques são feitos com aproximadamente 60 dias. Crescimento a 37°C

2. Meios de cultura

2.1. Meio de Leite Simples: Leite comum desengordurado, distribuído em tubos com tampa de rosca e tamanho de 15x150mm, esterilizados a 115°C durante 20 min

2.2. Meio para o “Fermento Lático”:

	g/L ou mL/L
Extrato de carne	1,5
Peptona	3,0
Lactose	20
Água de Tomate (2 kg/2L)	180
Carbonato de Cálcio	5,0
Água destilada ou equivalente	qsp
pH 6,8-7,0 ajustado com NaOH 20%	
Esterilização 110°C durante 15 min	

2.3. Meio de cultura para a contagem de células viáveis

O meio 2.2 sem carbonato mas adicionado de 2% de Ágar-ágar

2.4. Meio para controle da uniformidade da cultura e pesquisa de contaminantes. Em tubos com tampa de rosca e tamanho de 15x150mm, esterilizados a 110°C durante 15 min

	g/L ou mL/L
Extrato de carne	10
Peptona	30
Extrato de levedura	2
Glicose	10
Ágar-ágar	20
Água destilada ou equivalente	qsp
pH= 7,0-7,2 ajustado com NaOH	

2.5. Meio Iniciador ou Piloto

O mesmo meio 2.2 sem carbonato, mantido em balões de 5 L

3. Preparo do “Fermento Láctico”

- Repicar a cepa de *Lactobacillus* de meio de leite para o meio piloto
- Incubar de 24- 48 h a 37°C
- Controlar a pureza da cultura microscopicamente e também semeando-se no meio 2.4; incubar este último a 37°C e observar a presença ou não de contaminante
- Estando o meio piloto satisfatório, inocular o meio principal 2.2 contido nos balões cilíndricos
- O volume de meio por cada balão dependerá da quantidade e volume dos flaconetes com o produto que se deseja preparar
- O inóculo citado deverá ser uma proporção aproximada de 0,5 a 1,0 mL para cada 100 mL do meio 2.2. Incubar a 37°C durante 4 a 6 dias, conforme os resultados da contagem do número de células viáveis
- O meio fermentado deverá apresentar pelo menos 10 milhões de células vivas por mL
- Terminada a fermentação, guardar o produto em geladeira até a hora da distribuição asséptica nos flaconetes previamente esterilizados
- O mosto fermentado é também controlado quanto à pureza da cultura, do mesmo modo que no procedimento anteriormente citado.

4. Contagem do número de células viáveis

- Diluir amostras do “Fermento Láctico” proporcionalmente de modo a se conhecer o fator da diluição. Exemplo: 1/10, 1/100, 1/1000 etc, em salina estéril
- Tomar alíquotas das últimas diluições e colocar em placas de Petri estéreis (pelo menos 3 placas para cada alíquota)
- Cobrir com o meio 2.3 fundido e resfriado a 42°C-45°C, fazendo-se movimentos giratórios
- Deixar solidificar
- Incubar a 37°C durante pelo menos 72 h
- Contar as colônias de *Lactobacillus*, tirar a média e multiplicar pelo fator da diluição empregado relacionando-se com o volume inicial de meio
- O número de viáveis não deverá ser menor que 10 milhões de células por mL.

5. Armazenamento do produto

A longevidade das células bacterianas no produto depende de uma boa conservação em temperatura adequada, a qual poderá estar situada em torno de $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Observação:

- O “Fermento Lático” poderá ser liofilizado em flaconetes, devendo existir por cada flaconete 10^6 células viáveis por mL.

ANEXO 10 - ISOLAMENTO DE BASTONETES ESPORULADOS AERÓBIOS OU AERÓBIOS FACULTATIVOS GRAM-POSITIVOS DE MINÉRIOS

- Amostra de minério na embalagem original
- Pulverizar porção superior a 1g (se possível em gral de metal ou porcelana com pistilo, estéreis)
- Passar para frasco de cor âmbar e de boca larga, com tampa, estéril
- Homogeneizar o pulverizado girando o frasco em vários sentidos durante 5 min
- Em câmara asséptica, de 4 pontos aleatórios do pulverizado, retirar com espátula estéril 4 amostras de aproximadamente 250 mg (para formar 1g) e passar assepticamente para frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 99 mL de Tampão Butterfield, pH7.2 (Anexo 13), estéril
- Agitar forte por 5 min
- Transferir assepticamente 1 mL para tubo de ensaio contendo 9 mL de Tampão Butterfield pH 7,2 estéril e agitar
- Submeter a coluna líquida do tubo a um banho-maria a 80°C durante 20 min
- Inocular 100 µL e 200 µL em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura, usando espalhamento
- Meio VRM (lecitinase + seletividade, etc); Ágar Nutriente (AN); NYSM; incubar a 33°C durante 48 h

ANEXO 11 - SOLUÇÕES PADRÕES-PRIMÁRIAS PARA MEDIDAS ELETROMÉTRICAS DE pH (POTENCIÔMETRO DE ELETRODOS DE KCL) E USO DO POTENCIÔMETRO

1. Soluções Tampão Usadas na Calibração do Instrumento

O sistema de determinação de pH deve ser calibrado com a utilização de soluções tampão de pH. Estas são facilmente deterioradas pelo crescimento de fungos e outros microrganismos ou pela contaminação com espécies químicas, particularmente gases, surgindo daí a necessidade de sua renovação periódica (mensalmente).

Na preparação destas soluções, deve ser usada água destilada com condutividade menor que 2 μ mhos/cm, fervida e resfriada à temperatura de 25°C, contendo uma gota de solução saturada de KCl para cada 50 mL, estando seu pH entre 6-7.

Na análise de rotina, os tampões padrões de pH podem ser preparados com reagentes apresentados comercialmente na forma de comprimidos ou envelopes de quantidades especificadas para determinados volumes de água destilada. Acham-se também disponíveis no comércio soluções já prontas, mas sua aquisição não é recomendável a não ser que a qualidade possa ser atestada. Os reagentes utilizados na preparação das soluções tampão devem obedecer às especificações que as qualifiquem como reagentes de grau analítico (*AR-analytical reagent grade*).

Dos reagentes especificados para a preparação de tampões mais comuns, o Standard Methods³² (APHA, 1992) recomenda a secagem em estufa a 110°C-130°C por 2 h, somente de Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) antes da pesagem. Os outros sais, mesmo os hidratados, embora não haja recomendação expressa, podem ser mantidos em dessecador desde a noite anterior à preparação dos padrões.

1.1. Solução Tampão pH 4,00 (25°C) – Padrão primário

Pesar 10,12 g de Biftalato de potássio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$), dissolver em água destilada, de qualidade especificada, ambientada a 25°C e diluir para 1 L.

1.2. Solução Tampão pH 6,86 (25°C) – Padrão primário

Pesar 3,387 g de Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e 3,533 g de Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), solubilizar em água destilada própria para preparação do tampão, a 25°C, e diluir para 100 mL.

1.3. Solução Tampão pH 9,18 (25°C) – Padrão primário

Usar 3,80 g de Borato de sódio decahidratado [$\text{Na}_2\text{B}_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (borax)] para preparar 1 L desta solução a 25°C;

³² Standard Methods for the Examination of Wasterwater, (ALPHA, 1992), 18th edition. American Public Health Association, Washigton, D.C.

1.4. Solução Tampão pH 10,01 (25°C) – Padrão primário

Pesar 2,092 g de Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 2,640 g de Carbonato de sódio (Na_2CO_3), dissolver em água destilada especificada para o tampão a 25°C e diluir para 1 L.

1.5. Solução Tampão pH 1,68 (25°C) – Padrão secundário

Pesar 12,61 g de Tetroxalato de potássio dihidratado ($\text{KH}_3\text{C}_4\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dissolver em água destilada especificada para o tampão a 25°C e diluir para 1 L.

1.6. Solução Tampão pH 12,45 (25°C) – Padrão secundário

Usar mais 2 g de Hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] para preparar 1 L de uma solução saturada a 25°C. Filtrar o sobrenadante através de filtro de vidro de porosidade média e usá-lo como tampão. O Hidróxido de cálcio, usado para preparar a solução, pode ser obtido em laboratório a partir da calcinação, a 1000°C por uma hora, de Carbonato de cálcio (CaCO_3) com baixo teor de álcalis e bem lavado com água destilada. Depois da calcinação, esfriar, hidratar com água destilada e ferver. Resfriar, filtrar num filtro de vidro e coletar o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sólido para secar a 110°C. Secar, pulverizar e usar.

2. Soluções auxiliares – Usadas na limpeza dos eletrodos

2.1. Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N

Dissolver 4 g de NaOH em água destilada e completar para 1 L.

2.2. Ácido clorídrico (HCL) 0,1 N

Diluir 8,3 mL do ácido em água destilada e completar para 1 L.

2.3. Fluoreto de potássio (KF) solução ácida

Dissolver 2 g de KF em 2 mL de H_2SO_4 concentrado, diluir em água destilada e completar para 100 mL.

Procedimento

Calibração do instrumento

- A frequência de calibrações do peagômetro depende de frequência de medições e da qualidade do instrumental. Quando o instrumento é estável e as medições são frequentes, as padronizações são menos frequentes. No caso de as medições serem feitas ocasionalmente padronizar o instrumento antes do uso.
- Cada instrumento é, normalmente, acompanhado das instruções de uso as quais geralmente compreendem os seguintes passos:
- Ligar os instrumentos
- Antes do uso, lavar o(s) eletrodo(s) com água destilada, absorver o excesso de água com um papel absorvente macio
- Selecionar uma segunda solução tampão cujo pH situe-se próximo (± 2 unidades) do pH da amostra. É comum o uso dos tampões 4 ou 9, dependendo da faixa em que se situe o pH da amostra;
- Selecionar uma segunda solução tampão cujo o pH situa-se próximo (± 2 uidades) do pH da amostra. É comum o uso dos tampões 4 ou 9, dependendo da faixa em que se situe o pH da amostra;
- Trazer as temperaturas, tanto desse tampão como da amostra, para o mesmo valor que pode ser temperatura ambiente, a temperatura da amostra ou uma temperatura padronizada, por exemplo, 25°C. A temperatura escolhida será a temperatura de teste;
- Remover o(s) eletrodo(s) do primeiro tampão, enxaguá-lo(s) com água destilada e enxaguá-lo(s) com papel absorvente macio
- Introduzir o(s) eletrodo(s) na segunda solução tampão;
- Fazer a inclinação da linha reta potencial do eletrodo versus pH, ajustando a leitura do peagômetro ao valor de pH do tampão da temperatura do teste;
- Remover o(s) eletrodo(s) do segundo tampão, enxaguá-los com água destilada com papel absorvente macio;
- Introduzir o(s) eletrodo(s) na terceira solução tampão de pH abaixo de 10, mas cujo o valor seja cerca de três unidades diferentes do segundo tampão. Nestas condições a leitura deve corresponder ao pH do tampão para a temperatura do teste com uma precisão de $\pm 0,1$.

Medida do pH da amostra

- Agitar levemente a amostra com auxílio de um agitador magnético;
- Introduzir o(s) eletrodo(s) na amostra e, estabelecido o equilíbrio, fazer leitura do pH. Em amostras tamponadas ou de elevada força iônica condicionar o (s) eletrodo (s) mantendo-o (s) imerso (s), por 1 min, numa porção de amostra, enxugá-lo (s), imergí-lo (s) numa nova porção de amostra e ler o pH. Em amostras diluídas pouco tamponadas imergi o (s) eletrodo (s) em três ou quatro porções de amostra, sucessivamente e, por último, tomar uma nova porção da amostra e medir o pH. Na EXTRABES (Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários/DEC/CCT/UFPB), as amostras de águas residuárias domésticas brutas e tratadas em lagoas e reservatórios de estabilização não se enquadram rigorosamente, em nenhuma dessas categorias de amostras, sendo determinação procedida pela imersão do (s) eletrodo (s), lavado (s) e enxuto (s), no interior de um volume de cerca de 500 mL de amostra levemente agitada;
- Lavar o (s) eletrodo (s) com água destilada e enxuga-los com papel absorvente macio.

Manutenção

1. Eletrodos

- No início da operação seguir as instruções do fabricante para a preparação dos eletrodos;
- Após o início de operações, os eletrodos devem ser mantidos imersos em solução cuja composição depende do tipo de eletrodo, mas que, de um modo geral, tem condutividade maior que 4000 μ mhos/cm. Portanto, água destilada não deve ser usada para manter imersos os eletrodos sendo preferível, na falta de melhor alternativa, usar água da torneira. Os fabricantes, comumente, fazem as devidas recomendações sobre a solução da manutenção do (s) eletrodo (s), mas de um modo geral a solução tampão de pH=4 é a melhor escolha para o eletrodo de vidro e Cloreto de potássio (KCL) saturada é a melhor alternativa para eletrodo combinado e eletrodos de referência;
- Eletrodos de vidro são suscetíveis à diminuição da sensibilidade, resposta lenta e erros de leitura com duas soluções tampão devidos a riscos e arranhões, deterioração ou à acumulação de resíduos sobre a superfície de vidro. O 'rejuvenescimento' de tais eletrodos pode ser feito através do tratamento cíclico ácido-álcali que consiste na imersão do sensor em HCl 0,1N e, em seguida, em NaOH 0,1N repetindo-se o tratamento mais duas vezes. Algumas fabricantes sugerem condutas alternativas para o tratamento ácido-álcali, como é o caso da *Beckman* (Instrução 225 A) que recomenda imersão por 5 min, e outra em HCL 0,1N por igual período. Se o tratamento cíclico ácido álcali falhar imergir o sensor em solução auxiliar de Fluoreto de potássio durante 30 s. Depois do tratamento de rejuvenescimento, manter o eletrodo imerso em solução tampão de pH= 7 durante uma noite
- No caso do eletrodo combinado, imergir apenas o elemento sensor de pH

➡ Os defeitos (lentidão da resposta e leitura variável), associados ao eletrodo de referência, são normalmente devidos à obstrução da junção. Esta pode ser desobstruída pela aplicação de sucção à ponta do eletrodo ou por sua fervura em água destilada até quando for aplicada sucção o eletrólito flua livremente.

2. Peagômetro (pH-metro; potenciometro; medidor de pH)

A manutenção do peagômetro deve ser restrita às instruções contidas no manual do instrumento.

ANEXO 12 - SOLUÇÃO DESINFETANTE DE SEGURANÇA

	%
Formalina	5
Extran	2
Água destilada ou equivalente	qsp
Validade 12 meses	

Observação:

- Uso em bancadas de aço, fórmica, vidro, cerâmica, instrumentos de vidro, aço e polímeros.

ANEXO 13 - SALINA TAMPONADA - SATAMP

(Phosphate Buffered Dillution Water- Butterfield`s Buffer)³³

Solução Estoque

	g/L
Fosfato ácido de potássio (KH ₂ PO ₄)	34
Água destilada ou equivalente	qsp

- ➔ Ajustar o pH para 7,2 juntando solução de NaOH 1 N e completar para o litro com água destilada
- ➔ Esterilizar a 121°C durante 20 min e armazenar em refrigerador.

Diluição para uso: tomar 2,5 mL da solução estoque e diluir para 200 mL com água destilada. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

33. Food and Drug Administration Bureau of Foods – DM.1976 Appendix B, Page B-14. AOAC- US-WASHINGTON.

ANEXO 14 - ROTEIRO PARA TRATAMENTO ANTISSÉPTICO DE SUPERFÍCIE EXTERNA DE OVOS DE DIPTEROS³⁴

(Preparativos para o isolamento em cultura pura de microrganismos viáveis existentes no interior de ovos)

Operar em condições assépticas

- Colocar solução de álcool (etanol) absoluto 99,5% (v/v) ou álcool iodado a 1% (p/v) em recipiente estéril de boca de 3 cm, com tampa, de modo a formar coluna líquida de 5 cm de altura
- Mergulhar os ovos inteiros (jangadas, se for o caso) e deixar por 2-3 min. Não exceder
- Com ajuda de espátula apropriada, estéril, transferir as peças para igual recipiente e altura de coluna contendo água destilada ou similar estéril. Deixar por 2 min
- Transferir as peças com espátula estéril, para igual recipiente e altura de coluna líquida contendo solução de Hipoclorito de sódio a 2%
- Repetir a operação, item 3, acima
- Transferir para placa de Petri estéril e triturar com bastão de madeira descartável estéril até minúsculos fragmentos
- Transferir a massa triturada para tubo com o meio de cultura líquido desejado (para *Bacillus* usar p.ex. 10 mL de Caldo BHI, sem glicose)
- Incubar por até 72 h a 33-35 °C
- Espalhar por esgotamento na superfície do meio de cultura sólido contido em quatro placas de Petri (meio do item 7 solidificado com Ágar-ágar), incubar como o item 8. Pode-se usar outros meios de cultura mais ricos, como Agar Plate Count
- Isolar colônias com aspectos diferentes em cultura pura sempre no mesmo meio de cultura (líquido e depois sólido) e deste último examinar preparações de células vegetativas (também esporos) em esfregaços corados pelo Método de Gram ou Fucsina de Ziehl a 1:10

34. (Procedimento indicado por Leon Rabinovitch e Edmar Justo de Oliveirado Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz, março de 2012)

ANEXO 15 - CURVAS DE INATIVAÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus* PRESERVADOS E CONSERVADOS CONFORME MODELO CCGB.³⁵

(Liofilizados, à vácuo e a 3°C).

- Modelo de frasco montado da CCGB
- Preparar 12 frascos por cepa
- Tempo de experimento equivalente a 2 anos. Tomadas para ensaio de viabilidade: em intervalos de 3 meses
- Mínimo de pontos na curva: 10
- Guardar todos os frascos do mesmo modo e a semelhança daqueles que preservam e conservam cepas da CCGB (refrigerador)
- Temperatura de incubação do trabalho 33°C±1°C

Procedimento:

- Escolher 5 cepas de espécies de *Bacillus*
- Escolher uma cepa de *Bacillus* “amostra” tipo (indicação no Bergey’s); há algumas dessas cepas disponíveis na CCGB
- Preparar 12 frascos para cada cepa em papel de filtro
- Utilizar meio de cultura no qual se alcance alto percentual de esporulação, (ANM ver página 47) ou outro meio comprovado para esporulação acima de 80%
- Meio de cultura em placa de Petri para a contagem de colônias (Ágar Plate Count) ou BHI glicose
- Usar três placas para cada futuro ponto da curva. Cada placa leva na superfície do meio de cultura 1 gota (5µL) de cada diluição programada. P.ex: 10⁴, 10⁵, 10⁶
- Contagem de colônias sempre após 48 h de incubação a 33°C ±1°C. Tirar a média de 15 (três placas x cinco contagens por placa)
- Usar sempre o equipamento Quebec com sua lupa para contagem das Unidades Formadoras de Colônias, UFC
- Diluições da Suspensão –Mãe: 1 mL (Susp.-Mãe) + 9 mL (tubo) Solução NaCl a 0,85%

Na prática: Verificar qual a melhor diluição que permite contagem de colônias (guardar a frio por 1 semana antes de descartar).

- Diluição de: 1:10⁴ - 5 µL em 5 pontos da placa (3 placas)
- Diluição de: 1:10⁵ - 5 µL em 5 pontos da placa (3 placas)
- Diluição de: 1:10⁶ - 5 µL em 5 pontos da placa (3 placas)

35. Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos-CCGB

Fazer contagem inicial logo após o preparo dos frascos e usar 1 frasco de cepa do *Bacillus*

Resultados: O QUE SE ESPERA COMO RESULTADO é se a preservação e conservação funcionaram, oferecendo um mínimo de 400.000 UFC por papel de filtro para cada cepa após 2 anos em refrigerador

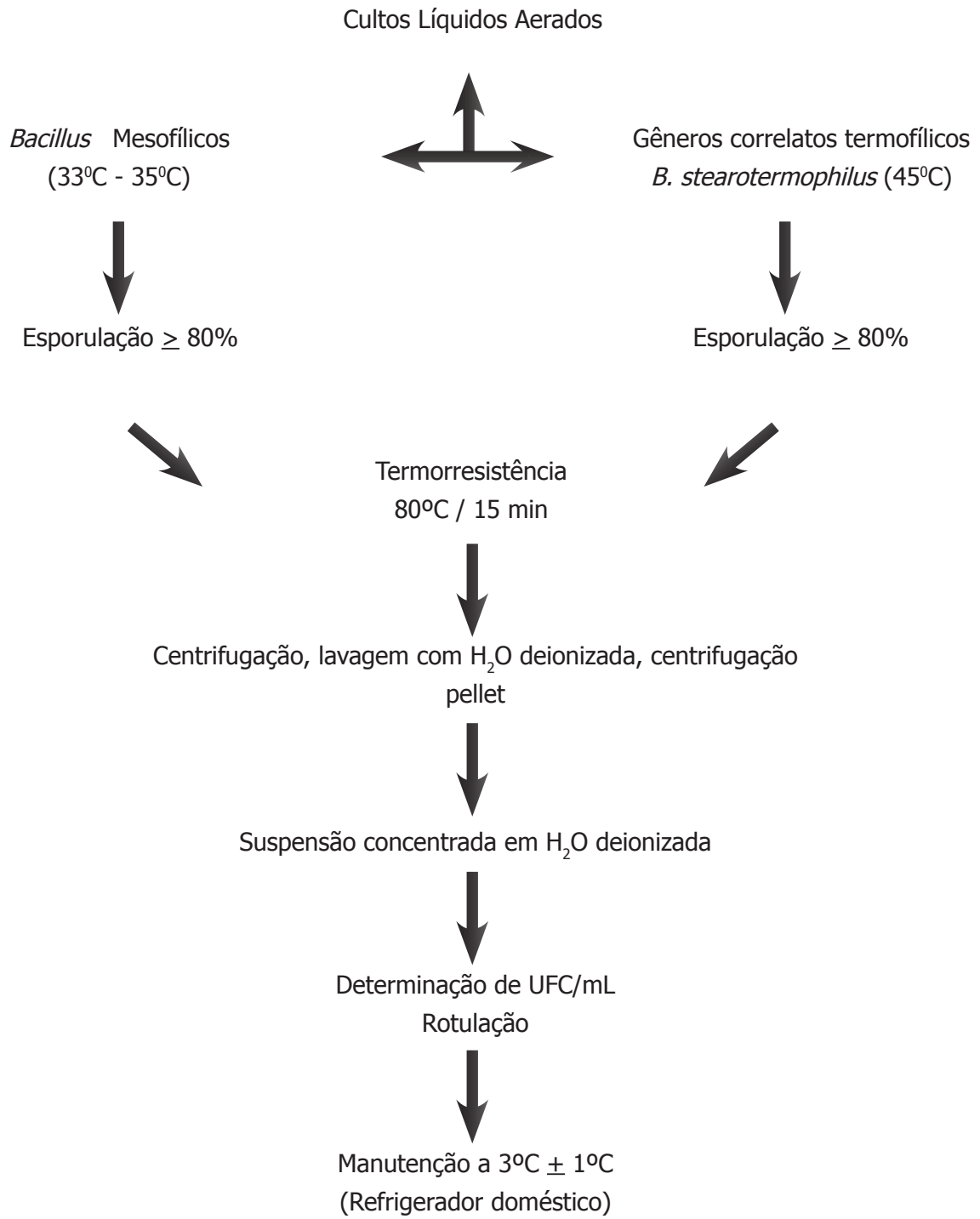
- Logo após o preparo dos frascos liofilizados, fazer as primeiras contagens para cada cepa (usando 3 placas com 5 gotas de 5 μ L cada colocados em 5 pontos equidistantes os quais permitirão em 3 placas a obtenção de 15 contagens por cepa. Cada ponto (n° de UFC) será resultante de 15 verificações atendendo à estatística e confiabilidade. O ponto será a média e calcular o desvio padrão $(x \pm y) = \delta$
- Então, para cada contagem a cada 3 meses ter-se-á 6 gráficos (1 ponto para cada cepa)

Preparo da Suspensão-Mãe a partir da tira de papel de filtro/frasco montado na CCGB

- Asepticamente retirar o papel com os esporos (usar pinça estéril)
- Passar para tubo com tampa de rosca contendo Salina Tamponada (SATAMP). pH 7,0
- Agitar em vortex por 30 min
- Fazer tomada de volume para diluições e as contagens de esporos

Observar que o tempo zero de cada suspensão-mãe será diferente um do outro

ANEXO 16 - SUSPENSÃO PADRONIZADA DE ESPOROS BACTERIANOS



ANEXO 17 - PRESERVAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE LINHAGENS DE ESPORULADOS AERÓBIOS GRAM-POSITIVOS A -196°C (NITROGÊNIO LÍQUIDO) COM GERMINAÇÃO E PREPARO DE INÓCULOS PARA USO CONSTANTE (LFB/IOC/FIOCRUZ)

- Produzir esporos livres, maduros, cultivando a estirpe (33-35°C) por 3 - 4 dias em meio de cultura sólido estimulador de esporogênese
- Suspende grosseiramente 1 alça cheia do cultivo esporulado com pelo menos 80% de esporos livres, maduros, em 3- 4 mL de leite estéril desnatado reconstituído em solução de água destilada contendo 30% de glicerol “para análise”. Ou, padronizar a suspensão pura operando de modo asséptico (densidade ótica)
- Se necessário, conservar em refrigerador (3° ± 1°C) por até 24 h
- Preparar 3 criotubos (identificados para as cepas que estão à preservação) com 6 tiras delgadas de 0,5 x 2,0 cm de lado em papel Whatman nº4 por criotubo
- Homogeneizar a suspensão de esporos e transferir 100 µL para os fragmentos de papel Whatman nº4, de modo a umedecê-los. Fechar as tampas de modo frouxo. Imediatamente colocar na estufa a 33-37°C por 72 h para secagem da suspensão já no papel e no criotubo. Após esse período apertar a tampa
- Preservar a -196°C em caixas apropriadas, mas passando antes pelo refrigerador (1 h), depois congelador (1 h) e por fim acondicionar no Nitrogênio líquido a -196°C
Para um inóculo visando ativação dos esporos que estão preservados a -196°C, permanecer com o criotubo no congelador (1 h), depois no refrigerador (1 h) e por fim na temperatura ambiente (1 h). A seguir, abrir assepticamente o criotubo para a retirada de uma tira de papel de filtro com auxílio de pinça “dente de rato” com extremidade estéril (flambada)
Inocular meio de cultivo líquido (por exemplo, Caldo Nutriente, Meio “J”, NYSM etc.), para germinação de esporos que vieram da tira de papel de filtro. Incubar 33-35°C

ANEXO 18 - ROTEIRO PARA TRATAMENTO ANTISSÉPTICO DE SUPERFÍCIE EXTERNA DE COPRÓLITO³⁶

(Preparatória para isolamento em cultura pura de microrganismos viáveis existentes no seu interior)

Operar em condições assépticas

- Colocar Solução de Álcool (etanol) Absoluto (99,5%, v/v) Iodado (1,0%) em recipiente estéril de modo a que forme coluna líquida de 5 cm de altura, dotado de boca de 3 cm, com tampa
- Mergulhar peça com mais ou menos 2 cm de diâmetro e deixar por 6 min
- Com ajuda de pinça dente-de-rato estéril, transferir a peça para igual recipiente e altura de coluna contendo água destilada estéril; deixar 2 min
- Transferir a peça, com mesma pinça estéril, para igual recipiente e altura de coluna contendo solução de Hipoclorito de sódio a 2%
- Repetir a operação item 3 acima
- Transferir para placa de Petri estéril e cortar a peça com bisturi estéril - em vários fragmentos
- Transferir 1 fragmento de mais ou menos 1cm de tamanho para tubo com o meio de cultura desejado (para *Bacillus* usar p.ex.10 mL de caldo BHI, sem glicose)
- Incubar por 72 h a 33-35°C
- Isolar em cultura pura e examinar preparações de células vegetativas (também esporos) em esfregaços corados pelo Método de Gram ou Fucsina de Ziehl a 1:10

36. Procedimento indicado por Leon Rabinovitch & Sônia Ermelinda do Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz, Fevereiro de 2011.

ANEXO 19 - PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPORULADAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO-MET E DE VARREDURA-MEV

Para a preparação de estoque de culturas

- ⇒ Preparar 4 tubos de ensaio contendo o meio de cultura Ágar Nutriente e inocular
- ⇒ Incubar a 33°- 35°C por 48-72 h até esporogênese total
- ⇒ Rotular e separar um dos tubos para a rotina
- ⇒ Vedar bem a tampa e conservar os tubos como estoque em refrigerador (3°C±1°C)

Preparação de células para fixação ou coloração para a observação de formas vegetativas

- ⇒ Do tubo de ensaio estoque separado e identificado por cor, retirar pequena porção de células e preparar um pré-inóculo contendo 5-6 mL do meio de cultura Caldo Nutriente
- ⇒ Incubar por 18-24 h a 33- 35° C
- ⇒ Adicionar o pré- inóculo em 30 mL de meio de cultura Caldo Nutriente
- ⇒ Incubar por 8-10 h a 33- 35° C
- ⇒ Centrifugar o crescimento (8000 rpm- 3 min) em 1 macrotubo (para MET, MEV e para Gram e Bartholomew)
- ⇒ Fazer os esfregaços em 4 lâminas e fixar à chama do bico de Bunsen
- ⇒ Corar pelos Métodos de Gram e Bartholomew
- ⇒ Lavar as células remanescentes com 1 mL de tampão (Salina Tamponada – SATAMP, ANEXO 13), 1 vez
- ⇒ Centrifugar (8000 rpm - 3 min)
- ⇒ Desprezar o sobrenadante
- ⇒ Juntar 1mL do fixador Glutaraldeído a 2,5% diluídos em Tampão Cacodilato de sódio a 0,1M
- ⇒ Deixar por uma noite
- ⇒ Centrifugar (8000 rpm - 1 min)
- ⇒ Retirar o fixador e descartá-lo em local apropriado. (**Atenção: Tóxico**)
- ⇒ Adicionar 1 mL do Tampão Cacodilato de sódio a 0,1M
- ⇒ Guardar em refrigerador

Para a observação de esporângios e esporos

- Do tubo estoque (Ágar Nutriente inclinado) separado e identificado por cor, retirar pequena porção de células inoculando-as em 30 mL de meio de cultura Ágar Nutriente com Metais (ANM) líquido contidos em Erlenmeyer de 100 mL
- Incubar por 24- 48 h com agitação (150 rpm)
- Centrifugar (4000 rpm- 3 min) para separar células
- Desprezar o sobrenadante
- Lavar as células com 1 mL de tampão (Salina Tamponada-SATAMP, ANEXO 13) uma vez
- Centrifugar (4000 rpm- 3 min)
- Desprezar o sobrenadante
- Juntar o fixador Glutaraldeído a 2,5%, 400µl diluídos em Tampão Cacodilato de sódio a 0,1M
- Deixar por uma noite
- Retirar o fixador e descartá-lo em local apropriado. **(Atenção: Tóxico)**
- Adicionar 500 µl do Tampão Cacodilato de sódio a 0,1M
- Guardar em refrigerador

ANEXO 20 - PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO DE ESPOROS

Preparo de suspensão-mãe para inóculo padrão

- Em 2 tubos com tampa de rosca de tamanho 15mm x 150mm contendo o meio de cultura Ágar Nutriente com Metais (ANM) inclinados, semear cepa de *Bacillus* ou de gêneros correlatos aeróbios e incubar a 33°C até obtenção de 80% de esporos, com controle de microscopia à fresco
- Transferir o crescimento dos 2 tubos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 35 mL de água destilada estéril e deixar sob agitação por 2 h
- Em 5 tubos de ensaio com tampa de rosca colocar 6 mL da suspensão e fazer termorresistência (TR) a 70°C por 15 min. Submeter os tubos em água corrente por 30 s. Reservar um tubo para uso e conservá-lo sob refrigeração. Os outros 4 ficarão guardados em temperatura de refrigerador.
- De um único tubo de TR, tomar 1 mL do inóculo e acrescentar em 9 mL de Salina estéril (NaCl 0,85%)
- Fazer diluição seriada na proporção de 1:10 e usar as diluições de 1:10³, 1:10⁴ e 1:10⁵
- Plaquear 100µl das diluições em placas com Ágar Nutriente ou Ágar Plate Count para contagem de colônias (3 placas para cada diluição).
- Incubar a 35°C por 30-40 h
- Calcular o número de UFC por mL, usando a média aritmética dos resultados.
- Colocar nos rótulos dos tubos de suspensão de esporos os valores das UFC por mL e outros dados (inclusive da cepa)
- Conservar em refrigerador ($\pm 3^{\circ}\text{C}$)
- Antes de usar deixar, o tubo para uso com a suspensão-mãe padronizada assumir para a temperatura ambiente.

Preparo de biomassa rica em esporos

- Tomar 50 µl de inóculo de esporos padronizado e transferir para 4 Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura NYSM ou outro meio líquido
- Deixar sob agitação a 33°C com 120-140 rpm até nova obtenção de esporos livres (controlar ao microscópio)
- Centrifugar até obter um sedimentado firme e desprezar o sobrenadante
- Lavar o sedimentado uma vez com água destilada estéril
- Centrifugar a 11000 rpm e desprezar o sobrenadante
- Suspender o sedimentado em 5 mL de salina estéril (pH 7,0-7,2)
- Distribuir 500 µl em 12 Eppendorf
- Centrifugar a 11000 rpm e desprezar o sobrenadante
- Separar 3 Eppendorf para determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) a partir de sedimento não irradiado. Calcular UFC por média aritmética

ANEXO 21 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA PADRONIZADA E FORMULADA DE *LYSINIBACILLUS SPHAERICUS 2362*

- Tomar 50 µL de inóculo padronizado ($1,5 \times 10^4$ /mL esporos de *L.sphaericus*) e adicionar em 100 mL do meio de cultura Caldo NYSM(*)
- Deixar sob agitação a 120-140 rpm, na temperatura de 33°C por cerca de 24 h
- Tomar 20 mL do crescimento e adicionar em 3 L de Caldo NYSM contido em dorna do Fermentador
- Deixar sob agitação a 600 rpm, aeração a 2 vvm, temperatura de 33°C por cerca de 24 h
- Centrifugar a 10.000 x g por 3 min
- Recolher a biomassa compactada e passar para Becher de 250 mL previamente tarado. Juntar aqui as biomassas de 4 fermentações e misturar bem por 10 min
- Juntar 5 mL de solução de Ácido propiônico 0,1M para cada uma das biomassas e misturar bem. pH 3,0 - 5,0
- Conservar sob refrigeração a 1- 3° C
- Fazer tomada de amostra da mistura de 4 biomassas não formuladas e submetê-la a (TR) 70°C (**) por 15 min. Utilizar as diluições 1:10³; 1:10⁴ 1:10⁵
- Contar UFC/massa úmida de biomassa
- Formular: Usar em relação à biomassa úmida (g% ou mL%): Nipagin M 0,10; Nipazol M 0,12; Ácido benzóico PA, ACS 0,15; Sorbato de K 0,5; Glicerol 20 e Carboxi metil celulose (CMC) 0,5, etc. Conservar o recipiente sob refrigeração
- Distribuir em Eppendorf ou frasco ampola
- Enviar para o CPqAM para determinação da Potência (UT/mg)

(*) Yousten. A. A. & Davidson. E.W. Ultrastructural Analysis of Spores and Parasporal Crystals Formed by *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl. Environ. Microbiology*. 1982, 44(6):1449.

(**) Temperatura adequada para a cepa *L. sphaericus* 2362

Preparo de biomassa de esporos de *Lysinibacillus sphaericus*- 2362 para submissão ao Co-60

- Tomar 50 µl de inóculo de esporos padronizado e transferir para 4 Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura NYSM ou outro meio líquido
- Deixar sob agitação a 33°C com 120-140 rpm até nova obtenção de esporos livres (controlar ao microscópio)
- Centrifugar até obter um sedimentado firme e desprezar o sobrenadante
- Lavar o sedimentado uma vez com água destilada estéril
- Centrifugar a 11000 rpm e desprezar o sobrenadante
- Suspender o sedimentado em 5 mL de salina estéril (pH 7,0-7,2)
- Distribuir 500 µl em 12 Eppendorf
- Centrifugar a 11000 rpm e desprezar o sobrenadante
- Separar 3 Eppendorf para determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) a partir de sedimento não irradiado. Calcular UFC por média aritmética
- Levar os demais Eppendorf com o sedimentado para submissão ao Co-60 (por exemplo, na COPPE/UFRJ)
- Determinar kgy

ANEXO 22 - METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS LIOFILIZADAS IMPREGNADAS EM PAPEL DE FILTRO (UFC/PAPEL DE FILTRO)*

- Abrir frasco-ampola e retirar, assepticamente, com auxílio de pinça estéril, o papel de filtro Whatman nº04 (dimensão 3,0 x 0,8 cm) contendo células (esporos), passando-o para Erlenmeyer de 100 mL de capacidade contendo 10 mL de solução estéril de NaCl a 0,85%
- Agitar em agitador a 120 rpm durante 2 h
- Tomar 1mL da suspensão e diluir em salina estéril, sequencialmente, na proporção de 1:10; 0,1mL das 3 maiores diluições são plaqueadas em triplicata em meio de cultura (Plate Count Agar-PCA, isto é, Tryptone Glucose Yeast Agar, Difco-0479-01-1), ou meio de cultura equivalente, espalhando com a alça de Drigalski, imprimindo-se giros à placa
- Incubar a 33° C por 35-40 h
- Contar as colônias formadas em todas as placas de uma mesma diluição que permitam leituras entre 30 e 300 colônias; somá-las e calcular a média/0,1mL
- Calcular as unidades formadoras de colônias (UFC) por papel de filtro existente no frasco-ampola

*Método adotado no LFB/IOC/FIOCRUZ

ANEXO 23 - METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS LIOFILIZADAS E NÃO LIOFILIZADAS³⁷

- Transferir 1 mL da suspensão-mãe para frasco-ampola. Congelar em “freezer” a -35°C e liofilizar como descrito em 5.1.1 do item 5 (Preservação e Conservação de Microrganismos para Produção Massal). No caso de contagem de células viáveis não liofilizadas, retirar 1 mL da suspensão mãe e proceder à diluição como no item 3 abaixo
- Abrir o frasco-ampola liofilizado assepticamente e, com auxílio de micropipeta Eppendorf estéril, adicionar 2 mL de solução estéril de NaCl a 0,85%
- Tomar 1 mL da suspensão e diluir em solução estéril de NaCl a 0,85%, sequencialmente, na proporção de 1:10; 0,1 mL das 3 maiores diluições são plaqueadas em triplicata em meio de cultura (Plate Count Agar-PCA, isto é, Tryptone Glucose Yeast Agar, Difco-0479-01-1), ou meio de cultura equivalente, espalhando com a alça de Drigalski, e imprimindo-se giros à placa
- Incubar a 33°C por 35-40 h
- Contar as colônias formadas em todas as placas de uma mesma diluição que permitam leituras entre 30 e 300 colônias; somá-las e calcular a média/0,1 mL
- Calcular as unidades formadoras de colônias (UFC). Para células liofilizadas, considerar o fator de ajuste multiplicando-se o resultado por 2 para que se obtenha o valor mais aproximado do número de células existentes no frasco-ampola

37. Método adotado no LFB/IOC/FIOCRUZ

ANEXO 24 - DETERMINAÇÃO DE PESO SECO-SUSPENSÕES MICROBIANAS

- As suspensões microbianas devem ser preparadas de modo a conter preferencialmente entre 5 mg a 10 mg de resíduo por 1 mL. Empregar balança analítica para as pesagens dotadas de sensibilidade até a quarta casa decimal
- Determinar a tara de cadinhos de fusão de forma baixa, capacidade de 10 mL e altura de 23 mm, de porcelana
- Passar 2 mL de suspensão para um cadinho previamente tarado. Usar triplicatas para cada determinação de peso
- Secar a suspensão em estufa a vácuo entre 95° C e 100° C por 20 h
- Retirar com auxílio de pinça e passar para dessecador de vidro dotado de torneira; aplicar o vácuo até o resfriamento
- Pesar rapidamente (evitar absorção de água do ar) e até a 4ª casa decimal. Anotar os valores
- Retornar os cadinhos ao dessecador e aplicar o vácuo. Após 2 h, tornar a pesar até a 4ª casa decimal. Anotar os valores. Descontar o peso dos cadinhos, somar os pesos obtidos e tirar a média aritmética
- Calcular o peso seco médio por mL de suspensão

Observação:

O peso seco da biomassa pode se prestar para informar a relação de UFC/ unidade de peso, por exemplo, UFC/g.

ANEXO 25 - DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ E CÁLCULO DAS UNIDADES TÓXICAS INTERNACIONAIS-UTI

(preparações à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*)

Preparo da suspensão de pó padrão de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* IPS 82 (15.000 ITU) ou sub-padrão equivalente preparado no LFB/IOC

- ⇒ Pesar 25 mg de pó do padrão e passar para balão volumétrico de 25 mL de capacidade
- ⇒ Completar com água potável (ver item 2)
- ⇒ Homogeneizar vigorosamente em agitador (vortex)
- ⇒ Esta diluição da toxina correspondente a $1 \times 10^3 = 1:1000$
- ⇒ Desta suspensão estoque preparar 1 mL:100 mL em água potável, que corresponderá a $1 \times 10^5 = 1:100.000$; daí diluir 1 mL:100 mL em água potável, que corresponderá a $1 \times 10^7 = 1:10.000.000$; daí, diluir novamente 1 mL:100 mL = $1 \times 10^9 = 1:1000.000.000$.

Com estas suspensões, preparar em triplicata a seguinte série de diluições diretamente em copos plásticos brancos contendo 100 mL de água potável (usar micropipetas) $1:10^{11}$ (1 mL de 1×10^9 diluído a 100 mL); 1×10^{10} (0,1 mL de 1×10^9 diluído a 100 mL); 5×10^{10} (0,5 mL de 1×10^9 diluído a 100 mL); 5×10^9 (5 mL de 1×10^7 diluídos a 100 mL) e 1×10^8 (0,1 mL de 1×10^5 diluído a 100 mL).

Determinação da DL₅₀

Curva Padrão – Usar 3 copos plásticos brancos para cada diluição. Cada copo conterá 100 mL da suspensão diluída em água potável. A água potável, antes do uso, poderá ficar em repouso por pelo menos 24 h dentro de um recipiente de boca larga (para facilitar a precipitação dos sais insolúveis, pós e também para aerar liberando o dobro). Colocar cerca de 20 larvas L₂/L₃ por copo. Uma ou duas larvas a mais das vinte por copo não afeta o resultado, pois serão consideradas nos cálculos finais.

Caso se tenha planejado 5 diluições para o pó padrão a fim de se construir a curva, serão necessários 18 copos, 3 dos quais conterão as larvas sem se adicionar o pó de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* padrão (larva controle). Serão utilizadas cerca de 360 larvas para esta curva padrão. Os copos ficarão a 25-27°C. Não alimentar as larvas. Larvas de *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* ou outra espécie poderão ser utilizadas.

DL₅₀ da preparação em exame

Como proceder para o caso da curva padrão. Caso necessário, utilizar um número maior de diluições da preparação. O sistema de copos é também em triplicata. Os copos com as larvas controles preparados para a curva padrão já são suficientes para esta dosagem. Pode-se empregar uma diluição a mais correspondente a 1×10^{11} , além das usadas para a curva padrão.

4. Resultados

As leituras das mortalidades serão feitas após 24 h quando o controle da mortalidade exceder 5%. As mortalidades nos copos tratados com *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* deverão ser corrigidas de acordo com a fórmula de ABBOTT. Mortalidades superiores a 10% no controle invalidarão o ensaio. Lançar os resultados em papel log-log, onde o percentual de morte fique ordenado contra as concentrações empregadas. Com base nos resultados de 24 h, o título de preparação em exame será:

$$\text{UTI/mg} = \frac{15000 \text{ ITU} \times \text{LC}_{50} \text{ do pó padrão } (Aedes \ aegypti)}{\text{LC}_{50} \text{ da preparação em exame } (ou \ outra \ espécie)}$$

Correção de Abbott- vide exemplo no Protocolo Experimental – Anexos I e II

Tabela 7 - Protocolo Experimental I - *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* – Pó Padrão Jerusalém, em 11-05-1989, Larvas de *Culex quinquefasciatus* L₂/L₃

Diluições	Nº copos	Quant. larvas	Mortalidade	Larvas vivas	Larvas mortas	Correção de Abbott %
Controle (Sem pó padrão)	1	21	1	20	5	-
	2	20	0	20	0	
	3	20	0	20	0	
1 x 10 ¹⁰					1,5(**)	17
	4	20	3	17	15	
	5	20	5	15	25	
5 x 10 ¹⁰	6	20	3	17	15	31
	7	20	6	14	30	
	8	20	6	14	30	
1 x 10 ⁹	9	20	7	13	35	47
	10	18	8	10	44	
	11	20	10	10	50	
5 x 10 ⁹	12	20	10	10	48(*)	69
	13	20	13	7	65	
	14	20	14	6	70	
1 x 10 ⁸	15	20	15	5	75	92
	16	20	19	1	95	
	17	20	17	3	85	
	18	20	19	1	95	
					92	

Observação: (1) O Controle está dentro dos 5% máximos permitidos
 (2) Correção de Abbott: $\frac{48\%(*) - 1,5\%(**)}{100} \times 100 = 46,5$ x 100 = 47%
 (Exemplo de Cálculo) $\frac{100\% - 1,5\%}{100} \times 100 = 98,5$

Tabela 8 - Protocolo Experimental II - *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* – 584; Liófilo - IPS 82, Meio Básico nº 3; 30 mg/30 ml). Jerusalém, em 11-05-1989, Larvas de *Culex quinquefasciatus* L₂/L₃

Diluições	Nº copos	Quant. larvas	Mortalidade	Larvas vivas	Larvas mortas	Correção de Abbott %
Controle (Sem IOC-584)	19	20	0	20		
	20	20	0	20		
	21	20	0	20	0	-
5 x 10 ¹⁰	22	20	5	15	25	
	23	20	3	17	15	20
	24	-	-	-	-	20
1 x 10 ⁹	25	20	8	12	40	
	26	20	12	8	60	
	27	20	9	11	45	48
5 x 10 ⁹	28	20	20	0	100	
	29	20	19	1	95	
	30	20	0	0	100	98
1 x 10 ⁸	31	20	20	0		
	32	20	20	0		
	33	20	20	0	100	100
1 x 10 ⁷	34	20	20	0		
	35	20	20	0		
	36	20	20	0	100	100

Observação: (1) *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* – IOC 584- Preparação LFB, Bac. IOC/FIOCRUZ

(2) Não havendo morte no controle, não há correção a proceder

ANEXO 26 - PRESERVAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE LINHAGENS DE ESPORULADOS AERÓBIOS GRAM-POSITIVOS A -70°C COM GERMINAÇÃO E PREPARO DE INÓCULOS PARA USO CONSTANTE (LFB/IOC/FIOCRUZ)

- Produzir esporos livres, maduros, cultivando a estirpe (33-35°C) por 3-4 dias em meio de cultura sólido estimulador de esporogênese
- Suspender grosseiramente 1 alça cheia do cultivo esporulado com pelo menos 80% de esporos livres, maduros, em 3-4 mL de leite estéril desnatado reconstituído em solução de água destilada contendo 30% de glicerol “ para análise”. Ou padronizar a suspensão pura operando de modo asséptico (densidade ótica)
- Se necessário, conservar em refrigerador (3°C±1°C) por até 24 h.
- Preparar 3 criotubos (identificados para as cepas que estão à preservação) com 6 tiras delgadas de 0,5 x 2,0 cm de lado em papel Whatman nº4 por criotubo
- Homogeneizar a suspensão de esporos e transferir 100 µL para os fragmentos de papel Whatman nº4, de modo a umedecê-los. Fechar as tampas de modo frouxo. Imediatamente colocar na estufa a 33-37°C por 72 h para secagem da suspensão já no papel e no criotubo. Após esse período, apertar a tampa
- Preservar a -70°C em caixas apropriadas, mas passando antes pelo refrigerador (1 h), depois congelador (1 h) e, por fim, acondicionar no freezer a -70°C
- Para um inóculo visando ativação dos esporos que estão preservados a -70°C, permanecer com o criotubo no congelador (1 h), depois no refrigerador (1 h) e, por fim, na temperatura ambiente (1 h). A seguir, abrir assepticamente o criotubo pra a retirada de uma tira de papel de filtro com auxílio de pinça “dente de rato” com extremidade estéril (flambada)
- Inocular meio de cultivo líquido (por exemplo, Caldo Nutriente, Meio “J”, NYSM etc.), para germinação de esporos que vieram da tira de papel de filtro. Incubar 33-35°C

ANEXO 27 - CONTAGEM NA CÂMARA DE PETROFF-HAUSSER

- ⇒ Depositar uma gota de suspensão homogênea de células sobre o retículo
- ⇒ Cobrir com lâminula e guardar por 15 min
- ⇒ Com a objetiva de imersão contar partículas em 10 ou 20 quadrados grandes.

Calcule :

$$\text{Bactérias ou esporos, ou cristais /mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de partículas contadas} \times \text{diluição empregada} \times 20 \times 10^6}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados contados}}$$

- ⇒ Colocar a câmara no desinfetante por 5 min (usar 5% de detergente comum em solução de formalina a 2%)
- ⇒ Lavar com água corrente (potável), secar e tornar a usar.

Observação:

- Este procedimento determina células viáveis e não viáveis

ANEXO 28 - METODOLOGIA PARA APLICAÇÃO DO TESTE API 50 CH® (BIOMÉRIEUX) PARA *Bacillus* E GÊNEROS CORRELATOS³⁸

- Semear por espalhamento em placa de Ágar Nutriente ou Ágar Sangue a cepa em teste objetivando obter colônias isoladas;
- Com 24 h de crescimento, selecionar as colônias que serão testadas, procurar aquelas que mais se assemelham entre si;
- Com auxílio de um “swab” ou semelhante, raspar as colônias de *Bacillus* e correlatos selecionados e fazer uma suspensão em frasco de solução salina de NaCl a 0,85% estéril contendo 5 mL, feita no próprio LFB;
- Homogeneizar e transferir determinados volumes para um tubo contendo solução salina a 0,85% estéril do fabricante até que se atinja a escala 2 de McFarland – esses volumes devem ser conhecidos;
- Homogeneizar e, a partir desse tubo com salina do fabricante, transferir o dobro do volume inoculado para o tubo contendo o meio de cultura do fabricante, se do tubo de solução salina do LFB foi transferido 1 mL para o tubo de salina do fabricante, deve-se transferir 2 mL do tubo de salina do fabricante para o meio de cultura do fabricante;
- Homogeneizar a suspensão e distribuir o volume até que preencha o microtubo da galeria API 50 CH® até a primeira linha; se a cepa for anaeróbia completar com óleo de parafina estéril até a borda;
- Incubar em estufa a 33°C por 24 h e realizar a leitura;
- Caso os resultados sejam positivos, o meio de cultura dentro do microtubo ficará com a cor AMARELA; caso sejam negativos, o meio permanecerá VERMELHO. O tubo contendo esculina (ESC) com leitura positiva ficará PRETO, e negativa VERMELHO.
- Incubar por mais 24 h em estufa a 33°C. Realizar a leitura;
- Se a primeira leitura for positiva e a segunda negativa, considerar a primeira, pois pode acontecer de a cepa utilizar o substrato que originou a cor amarelada;
- Anotar os resultados no formulário que vem junto com o “kit”.

38. Acessar o site: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/authenticate?action=preparelogin> ou seguir os “links” no site www.biomerieux-diagnostics.com. Na página principal haverá um “link” na parte superior, indicando Products. “Clicar” no “link” que abrirá uma página com algumas opções de produtos da empresa. No local onde se lerá Reagents selecionar API®Strips e “clicar” OK. Aparecerá um “link” com o nome API®Strips que redirecionará para a página. Na coluna à direita da página haverá um “link” [apiweb™](https://apiweb.biomerieux.com). Ao clicar nesse “link” se abrirá a página do [apiweb™](https://apiweb.biomerieux.com) e no seu começo haverá o seguinte texto: para abrir a página do [apiweb™](https://apiweb.biomerieux.com) PLEASE FOLLOW THIS LINK. Inserir os resultados de acordo com o formulário de preenchimento. Anotar os resultados.

ANEXO 29 - SELEÇÃO DE LINHAGENS NATURAIS DE *Bacillus* ENTOMOTÓXICOS ATRAVÉS DE PASSAGENS POR LARVAS DE MOSQUITO VETOR

Finalidades:

Selecionar cepas de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* que sejam dotadas de elevada toxicidade contra larvas de mosquito vetor, após 5 passagens sucessivas pelo inseto.

“Será possível a seleção de linhagens bacterianas mais tóxicas dentro de populações naturais entomopatogênicas?”

Fundamentos:

Algumas bactérias aeróbias e anaeróbias, esporuladas ou não, foram e ainda são usadas em processos fermentativos industriais, nos quais o aumento da produtividade é sempre susceptível às influências de diferentes fatores capazes de interferir na fisiologia, bioquímica e nutrição destes microrganismos.

A seleção de colônias originadas de esporos, melhor sintetizador de um dado produto de interesse, é procedimento conhecido há bastante tempo.

Por exemplo, a sucessiva seleção de esporos de *Clostridium acetobutylicum* após o aquecimento prévio de culturas esporuladas foi utilizada para obtenção de linhagens melhores produtoras de acetona e butanol. De modo análogo, a recuperação de formas capsuladas de *Streptococcus pneumoniae* e, assim, da patogenicidade desta bactéria é obtida pela passagem da mesma pelo peritônio de camundongos. Linhagens das mais toxigênicas de *Clostridium tetani* puderam ser conseguidas submetendo-se esporos deste anaeróbio à termorresistência seguida de semeadura em meio sólido.

Enfim, é sabido que bactérias patogênicas para o homem têm a virulência recuperada se forem submetidas a passagens por animais de laboratórios susceptíveis.

Procedimentos:

1. Fornecimento de suspensões de esporos–cristais para larvas de *Aedes* sp. e *Culex* sp.

1 mL de suspensão de esporos – cristais obtidos em meio de cultivo apropriado (AES-sólido, para *B. thuringiensis*, 3-5 dias a 33°C e NYSM para *Lysinibacillus sphaericus*, 2 dias a 30°C) e com densidade óptica (DO) ajustada para 0.1 a 600 nm, é submetida a TR (80°C por 15 min ou 70°C por 15 min, respectivamente) e depois adicionada a 150 mL de água potável, isenta de cloro, contendo 10-15 larvas L4 de mosquitos (usar duplicata). Incubar a 25°C ±1°C. Separar as larvas mortas após 24-48 h de incubação conforme a bactéria é empregada. Se necessário, congelar mantendo-as em tubos Eppendorf contendo 100 µl de água destilada estéril. Se não, triturá-las na água destilada estéril contida no tubo, com o auxílio de agulha bacteriológica estéril.

2. Isolamento de novas colônias de *Bacillus* a partir de larvas

Do material triturado na água destilada, tirar uma alça bacteriológica esgotada e inocular por espalhamento na superfície do meio de cultivo. Incubar por 48 h. Eleger colônia típica da espécie, examinar ao microscópio (2000x) em busca dos aspectos morfológicos e a presença de cristais de protoxinas (por microscopia óptica comum). Repicar para meio de cultivo apropriado em tubo e deixar esporular (2-5 dias) conforme a espécie. Preservar em refrigerador ($3^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$).

3. Preparo de nova suspensão de esporos–cristais para ensaio em larvas

Repetir o que foi feito nos itens 1 e 2. Ao término da 3ª passagem da bactéria pelas larvas, produzir esporos – cristais para um teste de determinação da LC_{50} . Preservar a linhagem em estudo por liofilização ou em meio de cultivo sólido (AES) em refrigerador.

Observação:

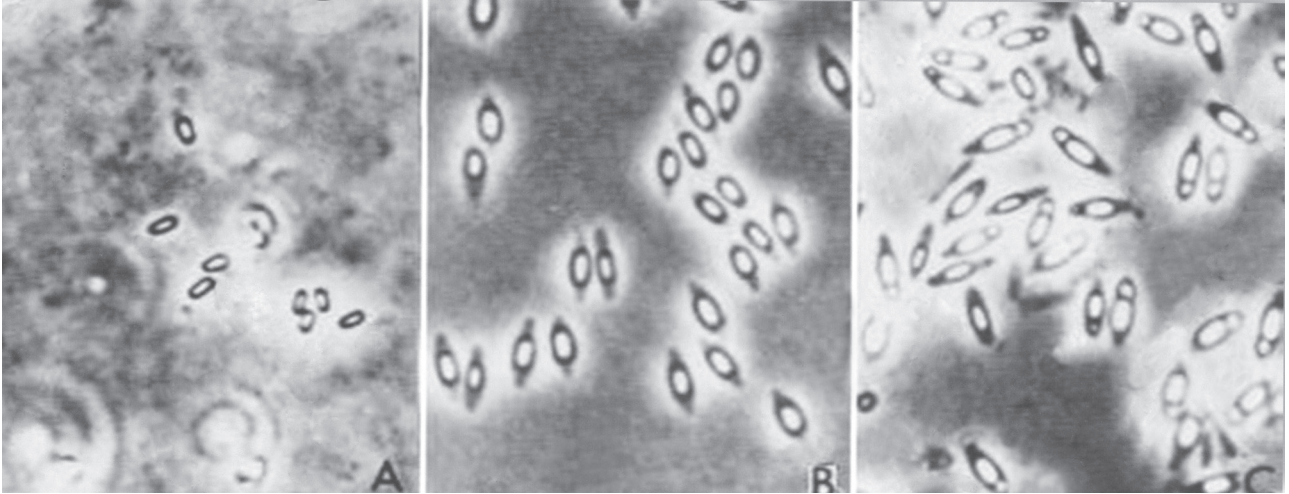
- Para o ensaio da LC_{50} , empregar também suspensão da bactéria contendo esporos–cristais previamente não transitados pelo trato digestório de larvas.

ANEXO 30 - MÉTODO RÁPIDO E EFICAZ PARA CONTAGEM DE ESPOROS NAS BIOMASSAS DE *Bacillus thuringiensis*.³⁹

- 5 mg de biomassa seca de cada cepa de *Bacillus thuringiensis* são suspensas em 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85%)
- As suspensões previamente homogeneizadas em vórtex são submetidas a choque térmico (80°C em banho-maria por 15 min, seguido de resfriamento em gelo por 5 min), para ensaio de termorresistência, com consequente eliminação de possíveis outros contaminantes nas biomassas secas
- Dessas suspensões-mãe são feitas diluições seriadas e decimais em salina estéril, de modo a se obter valores de $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:5 \times 10^{-4}$, $1:7,5 \times 10^{-4}$ e $1:10^{-5}$
- Das cinco últimas diluições, são retiradas alíquotas de 5 μ L que são depositadas em cinco pontos equidistantes da superfície do meio de cultura (ANM)
- São utilizadas três placas de Petri para cada diluição de cada cepa, sendo incubadas a 30°C por até 48 h
- Após este período, procede-se à contagem das colônias originadas dos esporos
- As contagens médias, após os cálculos, são expressas em unidades formadoras de colônias (UFC/ g) ou esporos viáveis por grama (esporos/g) de biomassa seca.

39. Lydston Rodrigues de Carvalho. Características biológicas, aspectos moleculares e busca de atividades entomotóxicas em linhagens autóctones de *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1915 dos sorovares oswaldocruzi (H-38) e brasiliensis (H-39). 2005. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Leon Rabinovitch.

ANEXO 31 - MORFOLOGIAS E DIFERENCIAÇÕES ENTRE ESPOROS NO GÊNERO *Bacillus* E GÊNEROS CORRELATOS



Esporos de entomopatógenos observados por microscopia de contraste-de-fase (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América). Figura 5a. Esporos de *Paenibacillus larvae* de um favo de mel infectado com Cria Pútrida Americana. Figura 6b. *Paenibacillus lentimorbus*, células vegetativas e esporos de hemolinfa de larva de “besouro Japonês”. Figura 7c. Esporos, células vegetativas e corpos paraesporais de *Paenibacillus popilliae*, de hemolinfa de larva de “besouro Japonês”. Esporos e corpos paraesporais envoltos pela membrana do exosporium.

Fonte: http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_4.html

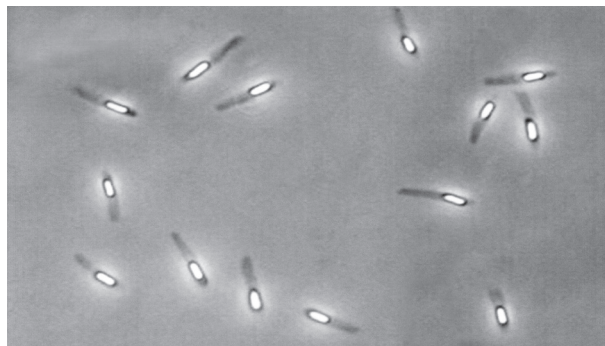


Figura 8: Esporângio (endósporo) de *Paenibacillus alvei*, esporos brilhantes sob microscopia de contraste-de-fase. Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Paenibacillus_alvei_endospore_microscope_image.tif

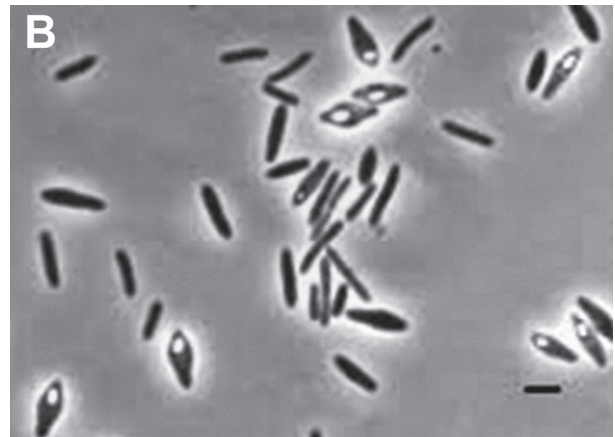
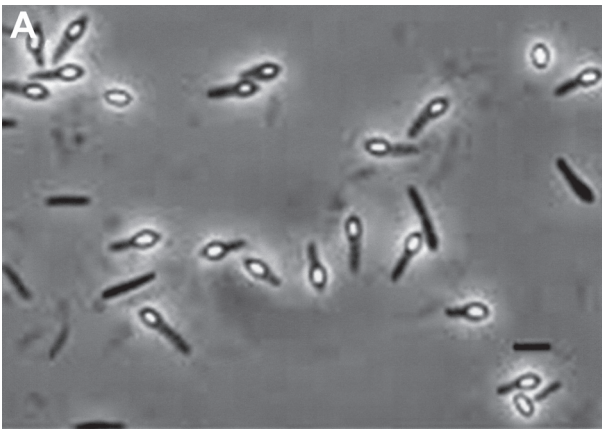


Figura 9a. Esporângios e células vegetativas de *Brevibacillus levickii* sp. nov., [cepa Logan B- 1657 (T)] examinada sob microscopia de contraste-de-fase. Esporos elipsoidais estão em posição subterminal e terminal em esporângios deformados (distendidos), barra representa 2 µm. Figura 10b. Esporângios e células vegetativas de *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., [estirpe Logan B- 1599(T)] observados sob microscopia de contraste-de-fase; esporos elipsoidais estão dispostos em posição central, às vezes em posição paracentral ou subterminal em esporângio deformado. Barra representa 2 µm.

Fontes: <http://ijs.sgmjournals.org/content/55/3/1039/F4.expansion>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879231>

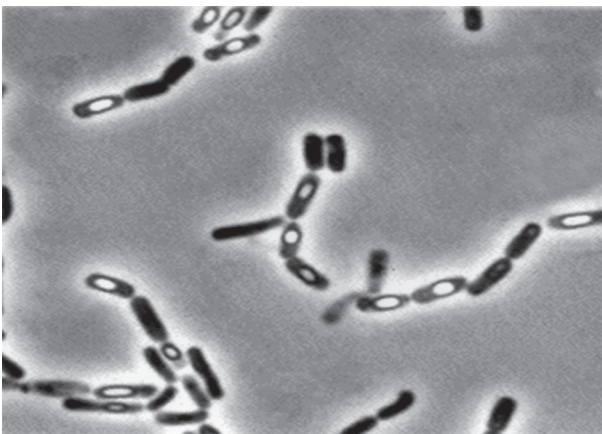


Figura 11. *Bacillus thuringiensis* sorovar *kurstaki*, esporângios mostrando esporos predominantemente cilíndricos e posição subterminal. Algumas células não estão esporuladas. Há esporângios com corpo paraesporal. Visualização sob contraste-de-fase. Barra representa 10 µm.

Fonte: <http://www.monografias.com/trabajos69/insecticidas-biologicos-control/insecticidas-biologicos-control2.shtml>

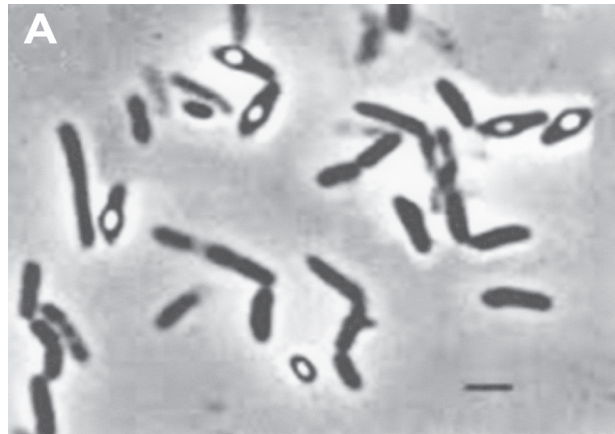


Figura 12a. *Virgibacillus necropolis* sp. nov., estirpe DSM 14866. Esporângios com esporos deformantes, preponderantemente subterminais e células vegetativas em cadeias curtas.

Fonte: <http://ijs.sgmjournals.org/content/53/2/501/suppl/DC1>

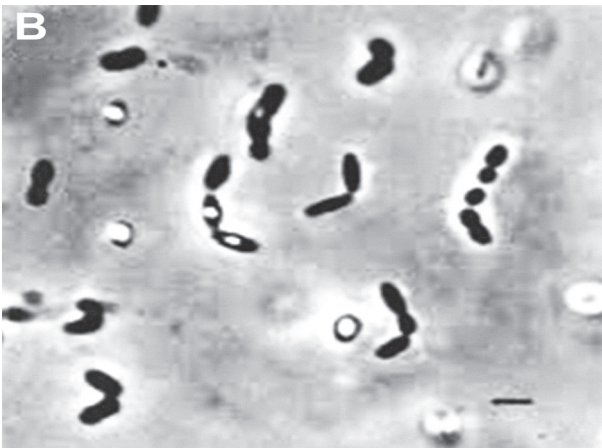


Figura 12b. *Oceanobacillus picturae* sp.nov. (*Virgibacillus picturae*). Células vegetativas pleomórficas, cadeias curtas, esporângios subterminais com esporos deformantes. Contraste-de-fase, barra representa 2 μ m.

Fontes: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403894> <http://ijs.sgmjournals.org/content/53/2/501/suppl/DC1>

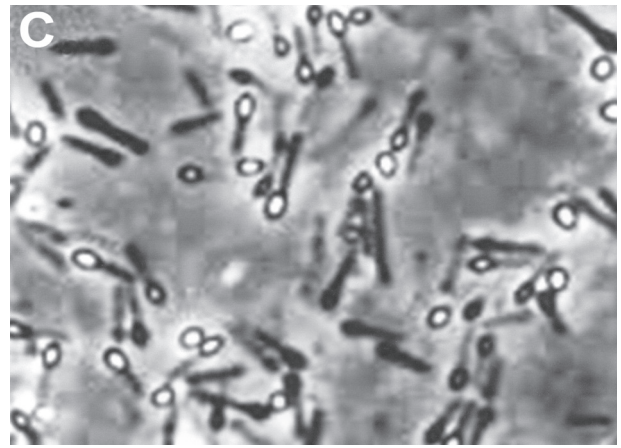


Figura 12c. *Virgibacillus carmonensiscepae* DSM 14868. Células vegetativas, esporângios deformantes terminais; observam-se esporos livres, maduros com morfologia predominantemente elipsoidal. Barra representa 2 μ m.

Fontes: <http://ijs.sgmjournals.org/content/53/2/501/suppl/DC1> <http://www.androidillustrated.com/q/Bacillaceae>

ANEXO 32 - MICROMETRIA⁴⁰

Micrometria:

Capítulo da microscopia ótica que possibilita determinar as dimensões de peças ou microorganismos de tamanhos mínimos, fazendo a medição em micrômetro (μm).

Finalidades:

- Determinação do coeficiente micrométrico para as objetivas de 4 x, 10 x, 40 x e 100 x.
- Medição do lado de um quadrado de uma grelha de microscopia eletrônica.
- Resolução de problemas de micrometria.
- Resolução de problemas em que se pretende a determinação de áreas e superfícies celulares.
- Medição do tamanho de células de *Bacillus* e gêneros correlatos, incluindo esporos livres maduros que são característicos.

Micrômetro da objetiva:

É uma régua graduada com 1mm e dividida em 100 partes iguais, que se coloca na platina de um microscópio.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mm} = 1000 \mu\text{m} \text{ ----- } 100 \text{ divisões} \\ \quad \quad \quad \times \text{ ----- } 1 \text{ divisão} \end{array}$$

Logo, cada divisão do micrômetro da objetiva vale 10 μm .

Ocular micrométrica:

É uma ocular na qual está gravada uma escala arbitrária (micrômetro ocular) com traços paralelos e intervalos iguais.

Calibrar a ocular micrométrica:

Determinar o valor em μm de cada intervalo da ocular micrométrica com o auxílio do Micrômetro da objetiva.

40. Procedimentos modificados e baseados em Fonte: files.psicologia1ano.webnode.pt/5ª20aula20PLP20SaúdeBH

Coeficiente micrométrico:

É o valor em micrômetro de cada divisão do micrômetro ocular para um determinado sistema ocular-objetivo. Coeficiente micrométrico é sinônimo de valor micrométrico da objetiva.

- 1. Coloque em posição a objetiva de 4 x.
- 2. Depois de iluminar o microscópio, coloque o micrômetro objetivo na platina e substitua uma das oculares pela ocular micrométrica.
- 3. A escala do micrômetro objetivo constitui o objeto a observar. A escala do micrômetro ocular e a imagem do micrômetro objetivo encontram-se no mesmo plano de focagem, surgindo sobrepostas na imagem.

Determinação dos coeficientes micrométricos:⁴¹

- 4. Gire a ocular micrométrica até que as duas escalas fiquem em paralelo, com os zeros para o mesmo lado.
- 5. Faça coincidir os zeros das duas escalas exatamente (Fig. 13).

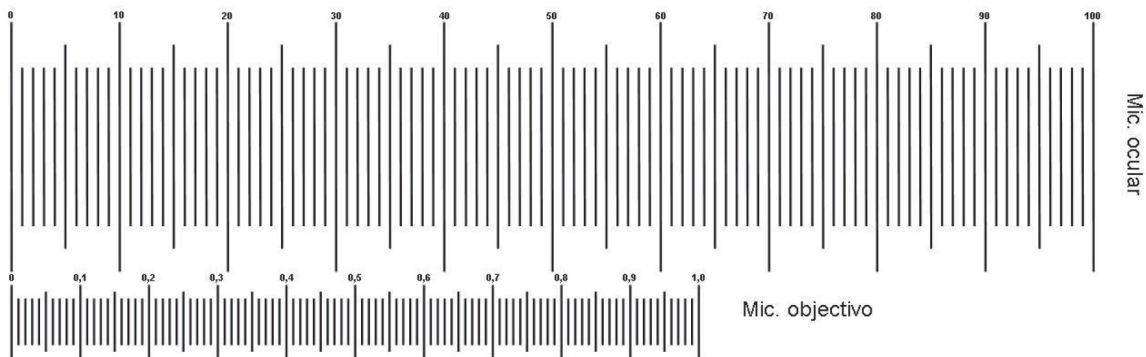


Figura 13: Os micrômetros da ocular e da objetiva

- 6. Excetuando os zeros, procure três pontos de interseção perfeita (permite fazer-se uma média diminuindo assim o grau de erro) entre as duas escalas e anote esses valores.
- 7. Determine o coeficiente micrométrico.
- 8. Repita o mesmo para as objetivas de 10 x e de 40 x.

41. Adaptações implantadas no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz-Fundação Oswaldo Cruz-Ministério da Saúde

Exemplo:

Para uma determinada objetiva (micro. ob.), se a 19 traços da ocular micrométrica (oc. micr.) correspondem 30 traços do micrómetro objetivo, qual o valor do coeficiente micrométrico?

$$19 \text{ div. oc. micr.} \text{-----} 30 \text{ div. micr. ob.} \times 10 \mu\text{m}$$

$$1 \text{ div. oc. micr.} \text{-----} x = 15,78 \mu\text{m} \approx 16 \mu\text{m}$$

Respostas:

Cada intervalo do micrômetro da ocular mede cerca de 16 μm .

Medição de um objeto:

Conhecido este valor-coeficiente micrométrico quando se pretende medir qualquer objeto usando aquela objetiva, bastará substituir o micrômetro objetivo pela preparação que contém o objeto em causa (célula vegetativa, esporo livre) contam-se traços da ocular micrométrica na que está compreendido o objeto. Multiplica-se o número de traços pelo valor de cada traço da escala.

Assim:

Se um objeto ocupar 20 divisões, multiplica-se por 16 μm , logo:

$$20 \text{ divisões} \times 16 \mu\text{m} = 320 \mu\text{m}$$

Resposta:

320 μm será o valor real do objeto considerado

Exercício de micrometria:

1º Exercício

Para determinado sistema ocular-objetiva, 40 divisões da ocular micrométrica correspondem a 12 divisões do micrômetro objetivo. Qual é o valor do coeficiente micrométrico?

$$40 \text{ div. oc. micr.} \text{-----} 12 \text{ div. micr. obj.} \times 10 \mu\text{m} = 120 \mu\text{m}$$

$$1 \text{ div. oc. micr.} \text{-----} x = 120 / 40 = 3 \mu\text{m}$$

Resposta:

O valor do coeficiente micrométrico é de 3 μm .

2º Exercício

A) O coeficiente micrométrico de determinado sistema ocular-objetiva é de $2\mu\text{m}$ e o comprimento de uma peça é de $10\mu\text{m}$. Quantos traços ocupa a peça?

Comprimento da peça = nº de div.x = coef. micr.

$10\mu\text{m} = y \times 2\mu\text{m} \Rightarrow y = 10/2 = 5$ traços.

Resposta:

A peça ocupa 5 divisões.

B) Qual o comprimento dessa mesma peça quando o coeficiente micrométrico é de $1\mu\text{m}$ e a peça ocupa 10 traços do micrómetro ocular?

Resposta:

$10\mu\text{m}$, pois se a peça é a mesma, a dimensão é a mesma.

Se o valor do coeficiente micrométrico do subitem a é maior do que o subitem da alínea b), a qual dos dois corresponde a maior ampliação da objetiva? Resposta: O da alínea b), uma vez que a medida que a ampliação aumenta, o coeficiente micrométrico da objetiva diminui.

ANEXO 33 - ESPÉCIES DE *Bacillus*, ESPÉCIES NOVAS E ESPÉCIES CORRELATAS EXISTENTES E RECLASSIFICAÇÃO, SEGUNDO ESTUDOS FILOGENÉTICOS INTRAESPECÍFICOS

Comparação da sequência do RNA ribossomal 16S.

(Retirado da Home Page <www.gbf.de:81/dsmz/bactnom/nam0379.htm>, atualizada em: Abril de 2015.)

O gênero *Bacillus* foi formado por um grupo de microrganismos que apresentam uma grande variabilidade genética entre as suas espécies. A porcentagem do conteúdo G + C das diversas espécies variavam de 32% a 69% e fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, etc) apresentam também uma grande variabilidade. Com a análise sequencial do ARNr 16S, em 1991, Ash e colaboradores reclassificaram o grupo em 51 espécies e 5 grupos filogenéticos. A partir deste ponto, outros estudos foram feitos e novos generos foram sendo criados. Em 1992 surgiu o gênero *Alicyclobacillus*, que agrupou três espécies acidófilas e termófilas seguindo por outros grupos como: *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus* (1996), *Gracilibacillus* (1999), *Geobacillus*, *Marinibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus* (2001), *Paenibacillus* (1994), *Salibacillus* (1999), *Ureibacillus* (2001), *Virgibacillus* (1998) e *Lysinibacillus* (2007). Todos esses grupos foram formados com espécies que inicialmente perteciam ao gênero *Bacillus* e novas espécies estão sendo identificadas dentro destes novos grupos como o *B.berkeleyi* (Neda shkovskaya et al. 2012); *Bacillus beringensis* (Yu et al. 2012); *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretière et al. 2013); *Bacillus daliensis* (Zhai et al. 2012); *Bacillus deserti* (Zhang et al. 2012); *Bacillus eiseniae* (Hong et al. 2012); *Bacillus endoradicis* (Zhang et al. 2012); *Bacillus iranensis* (Bagheri et al. 2012); *Bacillus kochii* (Seiler et al. 2012); *Bacillus purgationiresistens* (Vaz-Moreira et al. 2012); *Bacillus zhanjiangensis* (Chen et al. 2012).

Gênero *Bacillus* - Atualmente, encontramos 300 espécies e 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp, conforme o site www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html.



GÊNERO *Bacillus*

Genus: *Bacillus*

Authors: Cohn 1872

Status: genus (AL)

Type Species: *Bacillus subtilis*

Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL)

Family: *Bacillaceae*

Comment:

more information: LPSN (J.P. Euzéby/A.C. Parte)

Literature:

DSMZ Literature Ref.no:20409

Cohn, F. (1872). Untersuchungen über Bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 1 : 127-224 .

DSMZ Literature Ref.no:742

Bergey, D. H., Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., (1974). Bergey's manual of determinative Bacteriology. 8th. Edition Edited by R. E. Buchanan, The Williams & Wilkins Co.

Bacillus abyssalis

Authors: You et al. 2013
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3131 [Literature]
Type strain: SCSIO 15042, DSM 25875, CCTCC AB 2012074, NBRC 109102

Bacillus acidicer

Authors: Peak et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2035* [Literature]
Type strain: CBD 119, NRRL B-41736, DSM 18954

Bacillus acidicola

Authors: Albert et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2129* [Literature]
Type strain: 105-2, ATCC BAA-366, DSM 14745, NRRL B-23453

Bacillus acidiproducens

Authors: Jung et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2230* [Literature]
Type strain: SL213, JCM 14638, KCTC 13078

Bacillus acidocaldarius

Authors: Darland and Brock 1971
Status: species (AL)

Reference: nt. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 27009, DSM 446, IMET 11356, NCIB 11725
Synonym(s): *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius*
Alicyclobacillus acidocaldarius

Bacillus acidoterrestris

Authors: Deinhard et al. 1988
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 38:220 [Literature]
Type strain: DSM 3922, GD3B
Synonym(s): *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Bacillus aeolius

Authors: Gugliandolo et al. 2003
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1701 [Literature]
Type strain: 4-1, CIP 107628, DSM 15084

Bacillus aerius

Authors: Shivaji et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1471* [Literature]
Type strain: 24K, JCM 13348, MTCC 7303

Bacillus aerophilus

Authors: Shivaji et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1471* [Literature]
Type strain: 28K, JCM 13347, MTCC 7304

Bacillus agaradhaerens

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879
[Literature]
Type strain: DSM 8721,PN-105

Bacillus agri

Authors: Nakamura 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:23*
[Literature]
Type strain: DSM 6348,NRRL NRS-1219
Synonym(s): *Brevibacillus agri*, *Bacillus galactophilus*

Bacillus ainingensis

Authors: Xue et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2831* [Literature]
Type strain: 17-5,CGMCC 1.3227,DSM 18341

Bacillus akibai

Authors: Nogi et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2314* [Literature]
Type strain: 1139,ATCC 43226,JCM 9157

Bacillus alcalophilus

Authors: Vedder 1934
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 27647,DSM 485,NCIB 10436,NCIB 8772,NCTC 4553

Bacillus algicola

Authors: Ivanova et al. 2004
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1425 [Literature]
Type strain: CIP 107850,KMM 3737

Bacillus alginolyticus

Authors: Nakamura 1987
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 37:284* [Literature]
Type strain: DSM 5050,NRRL NRS-1347
Synonym(s): *Paenibacillus alginolyticus*

Bacillus alkalidiazotrophicus

Authors: Sorokin et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2463* [Literature]
Type strain: MS 6,NCCB 100213,UNIQEM U377
Synonym(s): *Anaerobacillus alkalidiazotrophicus*

Bacillus alkalinitrilicus

Authors: Sorokin et al. 2009
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1 [Literature]
Type strain: ANL-iso4,NCCB 100120,UNIQEM U240

Bacillus alkalisediminis

Authors: Borsodi et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1885* [Literature]
Type strain: K1-25,DSM 21670,NCAIM B02301

Bacillus alkalitelluris

Authors: Lee et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2632* [Literature]
Type strain: BA288,KCTC 3947,DSM 16976

Bacillus altitudinis

Authors: Shivaji et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1472* [Literature]
Type strain: 41KF2b,JCM 13350,MTCC 7306

Bacillus alveayuensis

Authors: Bae et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1214* [Literature]
Type strain: JCM 12523,KCTC 10634,TM1

Bacillus alvei

Authors: Cheshire and Cheyne 1885
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 6344,CCM 2051,DSM 29,NCIB 9371,NCTC 6352
Synonym(s): *Paenibacillus alvei*

Bacillus amyloliquefaciens

Authors: (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987 emend. Wang et al. 2008
Status: sp. nov., nom. rev. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 37:69* [Literature]
Type strain: ATCC 23350,DSM 7,NCAIM B.01704,NRRL B-14393,CCUG 28519,CFBP 4246,CIP 103265,HAMBI 1824,IFO (now NBRC) 15535,LMG 9814,F
Synonym(s): *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*; *Bacillus velezensis*

Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens

Authors: Borris (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987
Status: subsp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1799* [Literature]
Comment: subspecies automatically created by the valid publication of *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* according to Rule 40d
Type strain: Fukumoto strain F,DSM 7,ATCC 23350
Synonym(s): *Bacillus amyloliquefaciens*
Bacillus velezensis (heterotypic syn.)

Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum

Authors: Borris et al. 2011
Status: subsp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1799* [Literature]
Type strain: FZB42,BGSC 10A6,DSM 23117

Bacillus amylolyticus

Authors: Nakamura 1984
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:224* [Literature]
Type strain: ATCC 9995, DSM 3034, NRRL B-377, NRRL NRS-290
Synonym(s): *Paenibacillus amylolyticus*

Bacillus andresenii

Authors: Kosowski et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:93* [Literature]
Type strain: 8-4-E13, DSM 23948, LMG 27602

Bacillus aneurinilyticus

Authors: corrig. Shida et al. 1994
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 44:146* [Literature]
Comment: nom. corrig.: *Bacillus aneurinolyticus* (sic)
Type strain: ATCC 12856, DSM 5562, IAM 1077, IFO 15521, JCM 9024
Synonym(s): *Aneurinibacillus aneurinilyticus*; *Bacillus aneurinolyticus*

Bacillus aneurinolyticus

Authors: Shida et al. 1994
Status: orthographically incorrect name
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 44:146*
Synonym(s): *Aneurinibacillus aneurinilyticus*; *Bacillus aneurinilyticus*

Bacillus anthracis

Authors: Cohn 1872
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14578

Bacillus aquimaris

Authors: Yoon et al. 2003
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1302* [Literature]
Type strain: JCM 11545, KCCM 41589, TF-12

Bacillus arenosi

Authors: Heyrman et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:115* [Literature]
Type strain: DSM 16319, LMG 22166
Synonym(s): *Viridibacillus arenosi*

Bacillus arseniciselenatis

Authors: corrig. Switzer Blum et al. 2001
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:793 [Literature]
Comment: nom. corrig.: *Bacillus arsenicoselenatis* (sic)
Type strain: ATCC 700614, E1H
Synonym(s): *Anaerobacillus arseniciselenatis*; *Bacillus arsenicoselenatis*

Bacillus arsenicoselenatis

Authors: Switzer Blum et al. 2001
Status: orthographically incorrect name
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:793

Synonym(s): *Anaerobacillus arseniciselenatis*; *Bacillus arseniciselenatis*

Bacillus arsenicus

Authors: Shivaji et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1126* [Literature]
Type strain: Con a/3, DSM 15822, JCM 12167, MTCC 4380
Synonym(s): *Fictibacillus arsenicus*

Bacillus arvi

Authors: Heyrman et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:115* [Literature]
Type strain: DSM 16317, LMG 22165
Synonym(s): *Viridibacillus arvi*

Bacillus aryabhatai

Authors: Shivaji et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2984* [Literature]
Type strain: B8W22, JCM 13839, MTCC 7755, DSM 21047

Bacillus asahii

Authors: Yumoto et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2000* [Literature]
Type strain: JCM 12112, MA001, NCIMB 13969

Bacillus atrophaeus

Authors: Nakamura 1989
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:299* [Literature]
Type strain: DSM 7264, NRRL NRS-213

Bacillus aurantiacus

Authors: Borsodi et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:850* [Literature]
Type strain: K1-5, CCM 7447, DSM 18675, NCAIM B002265

Bacillus axarquiensis

Authors: Ruiz-García et al. 2005
Status: sp. nov. (VP), heterotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1283* [Literature]
Comment: later heterotypic synonym of *Bacillus mojavensis*
Type strain: CECT 5688, CR-119, LMG 22476
Synonym(s): *Bacillus mojavensis*; *Bacillus malacitensis*

Bacillus azotofixans

Authors: Seldin et al. 1984
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:453* [Literature]
Type strain: ATCC 35681, DSM 5976, P3L-5
Synonym(s): *Paenibacillus durus*; *Clostridium durum*; *Paenibacillus azotofixans*; *Paenibacillus durum*

Bacillus azotoformans

Authors: (ex Pichinoty et al. 1976) Pichinoty et al. 1983
Status: sp. nov., nom. rev. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 33:660* [Literature]
Type strain: ATCC 29788, CCM 2849, CIP R925, DSM 1046

Bacillus badius

Authors: Batchelor 1919
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14574, CCM 2113, DSM 23, NCIB 9364, NCTC 10333

Bacillus barbaricus

Authors: Täubel et al. 2003
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:729* [Literature]
Type strain: CCM 4982, DSM 14730, V2-BIII-A2
Synonym(s): *Fictibacillus barbaricus*

Bacillus bataviensis

Authors: Heyrman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:56* [Literature]
Type strain: DSM 15601, IDA1115, LMG 21833, R-16315

Bacillus beijingensis

Authors: Qiu et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:732* [Literature]
Type strain: ge10, CGMCC 1.6762, DSM 19037
Synonym(s): *Bhargavaea beijingensis*

Bacillus benzoevorans

Authors: Pichinoty et al. 1987
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 37:179 [Literature]
Type strain: B1, CCM 3364, DSM 5391

Bacillus beringensis

Authors: Yu et al. 2012
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:2549 [Literature]
Type strain: BR035, CGMCC 1.9126, DSM 22571

Bacillus berkeleyi

Authors: Nedashkovskaya et al. 2012
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:1017 [Literature]
Type strain: KMM 6244, KCTC 12718, LMG 26357

Bacillus beveridgei

Authors: Baesman et al. 2010
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1985 [Literature]
Type strain: DSM 22320, MLTeJB, ATCC BAA-1786

Bacillus bogoriensis

Authors: Vargas et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:901* [Literature]
Type strain: ATCC BAA-922, LBB3, LMG 22234

Bacillus boroniphilus

Authors: Ahmed et al. 2007
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:893 [Literature]
Type strain: T-15Z, DSM 17376, IAM 15287
Synonym(s): "*Bacillus borophilus*"

Bacillus borstelensis

Authors: Shida et al. 1995
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:98* [Literature]
Type strain: DSM 6347, IFO 15714, JCM 9022, NRRL NRS-818
Synonym(s): *Brevibacillus borstelensis*

Bacillus brevis

Authors: Migula 1900
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 8246, CCM 2050, DSM 30, NCIB 9372, NCTC 2611
Synonym(s): *Brevibacillus brevis*

Bacillus butanolivorans

Authors: Kuisiene et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:508* [Literature]
Type strain: K9, DSM 18926, LMG 23974

Bacillus canaveralii

Authors: Newcombe et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2018* [Literature]
Type strain: KSC SF8b, ATCC BAA-1493, MTCC 8908

Authors: Fujita et al. 1996

Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:118* [Literature]
Type strain: JCM 9731, Kasumi 6

Bacillus cecembensis

Authors: Reddy et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2334* [Literature]
Type strain: PN5, JCM 15113, LMG 23935, MTCC9127

Bacillus cellulosilyticus

Authors: Nogi et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2314* [Literature]
Type strain: DSM 2522, JCM 9156, N-4

Bacillus centrosporus

Authors: Nakamura 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:24* [Literature]
Type strain: DSM 8445, NRRL NRS-664
Synonym(s): *Brevibacillus centrosporus*

Bacillus cereus

Authors: Frankland and Frankland 1887
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14579,CCM 2010,DSM 31,NCIB 9373,NCTC 2599
Synonym(s): "*Bacillus medusa*"

Bacillus chagannorensis

Authors: Carrasco et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2087* [Literature]
Type strain: CG-15,CCM 7371,CECT 7153,CGMCC 1.6292,DSM 18086

Bacillus chitinolyticus

Authors: Kuroshima et al. 1996
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:79* [Literature]
Type strain: DSM 11030,EAG-3,IFO 15660
Synonym(s): *Paenibacillus chitinolyticus*

Bacillus chondroitinus

Authors: Nakamura 1987
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 37:284* [Literature]
Type strain: DSM 5051,NRRL NRS-1351
Synonym(s): *Paenibacillus chondroitinus*

Bacillus choshinensis

Authors: Takagi et al. 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:229* [Literature]
Type strain: DSM 8552,HPD52,JCM 8505
Synonym(s): *Brevibacillus choshinensis*

Bacillus chungangensis

Authors: Cho et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1351* [Literature]
Type strain: CAU 348,CCUG 57835,KCTC 13566

Bacillus cibi

Authors: Yoon et al. 2005
Status: sp. nov. (VP), heterotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:735* [Literature]
Comment: synonymy: IJSEM 64:3807*
Type strain: DSM 16189,JG-30,KCTC 3880
Synonym(s): *Bacillus indicus*

Bacillus circulans

Authors: Jordan 1890
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 4513,CCM 2048,DSM 11,IMET 11259,NCIB 9374,NCTC 2610

Bacillus clarkii

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8720,PN-102

Bacillus clausii

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8716,NCIMB 10309,PN-23

Bacillus coagulans

Authors: Hammer 1915 emend. De Clerck et al. 2004
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 7050,DSM 1,IMET 10993
Synonym(s): "*Bacillus dextralacticus*"

Bacillus coahuilensis

Authors: Cerritos et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:922* [Literature]
Type strain: m4-4,CECT 7197,NRRL B-41737

Bacillus cohnii

Authors: Spanka and Fritze 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:155* [Literature]
Type strain: DSM 6307,RSH

Bacillus composti

Authors: Yang et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3034* [Literature]
Type strain: SgZ-9,CCTCC AB 2012109,KACC 16872

Bacillus curdlanolyticus

Authors: Kanzawa et al. 1995
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:517* [Literature]
Type strain: DSM 10247,IFO 15724,YK9
Synonym(s): *Paenibacillus curdlanolyticus*

Bacillus cycloheptanicus

Authors: Deinhard et al. 1988
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 38:220 [Literature]
Type strain: DSM 4006,SCH
Synonym(s): *Alicyclobacillus cycloheptanicus*

Bacillus cytotoxicus

Authors: Guinebretière et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:39* [Literature]
Type strain: NVH 391-98,CIP 110041,DSM 22905

Bacillus daliensis

Authors: Zhai et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:952* [Literature]
Type strain: DLS13,CGMCC 1.10369,JCM 17097,NBRC 107572

Bacillus decisifrondis

Authors: Zhang et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:978* [Literature]
Type strain: E5HC-32,JCM 13601,DSM 17725

Bacillus decolorationis

Authors: Heyrman et al. 2003
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:462* [Literature]
Type strain: DSM 14890, LMG 19507

Bacillus deserti

Authors: Zhang et al. 2012
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:2549 [Literature]
Type strain: ZLD-8, CCTCC AB 207173, KCTC 13246

Bacillus dipsosauri

Authors: Lawson et al. 1996
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:1189 [Literature]
Type strain: DD1, DSM 11125, NCFB 3027
Synonym(s): *Gracilibacillus dipsosauri*

Bacillus drentensis

Authors: Heyrman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:56* [Literature]
Type strain: DSM 15600, IDA1967, LMG 21831, R-16337
more information: LPSN (J.P. Euzéby/A.C. Parte)

Bacillus edaphicus

Authors: Shelobolina et al. 1998
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 48:631 [Literature]
Type strain: DSM 12974, T7, VKPM B-7517
Synonym(s): *Paenibacillus edaphicus*

Bacillus ehimensis

Authors: Kuroshima et al. 1996
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:79* [Literature]
Type strain: DSM 11029, EAG-5, IFO 15659
Synonym(s): *Paenibacillus ehimensis*

Bacillus eiseniae

Authors: Hong et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:2082* [Literature]
Type strain: A1-2, JCM 16993, KCCM 90092

Bacillus enclensis

Authors: Dastager et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1455 [Literature]
Type strain: SGD-1123, CCTCC AB 2011125, NCIM 5450
more information: LPSN (J.P. Euzéby/A.C. Parte)

Bacillus endophyticus

Authors: Reva et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:106* [Literature]
Type strain: 2DT, CIP 106778, DSM 13796, UCM B-5715

Bacillus endoradicis

Authors: Zhang et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:362* [Literature]
Type strain: CCBAU 05776, HAMBI 3097, LMG 25492

Bacillus farraginis

Authors: Scheldeman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1362* [Literature]
Type strain: DSM 16013, LMG 22081, MB 1885, R-6540

Bacillus fastidiosus

Authors: den Dooren de Jong 1929
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 29604, Delft LMD 29-14, DSM 91, LMD 29-14, NCIB 11326

Bacillus fengquiensis

Authors: Zhao et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2854* [Literature]
Type strain: NPK15, DSM 26745, CCTCC AB 2013156

Bacillus firmus

Authors: Bredemann and Werner 1933
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14575, CCM 2213, DSM 12, NCIB 9366, NCTC 10335
Synonym(s): "*Bacillus flavidus*"

Bacillus flexus

Authors: (ex Batchelor 1919) Priest et al. 1989
Status: sp. nov., nom. rev. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:93 [Literature]
Type strain: ATCC 49095, DSM 1320, NRS 665
Synonym(s): "*Bacillus agrestis*"

Bacillus foraminis

Authors: Tiago et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2573* [Literature]
Type strain: CV53, LMG 23174, CIP 108889

Bacillus fordii

Authors: Scheldeman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1363* [Literature]
Type strain: DSM 16014, LMG 22080, MB 1878, R-7190

Bacillus formosus

Authors: Shida et al. 1995
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:98* [Literature]
Type strain: DSM 9885, IFO 15716, JCM 9169, NRRL NRS-863
Synonym(s): *Brevibacillus formosus*

Bacillus fortis

Authors: Scheldeman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1362* [Literature]
Type strain: DSM 16012, LMG 22079, R-6514

Bacillus fumarioli

Authors: Logan et al. 2000
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1751* [Literature]
Type strain: LMG 17489, Rcp Sm1

Bacillus funiculus

Authors: Ajithkumar et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1143* [Literature]
Type strain: CIP 107128, JCM 11201, NAF001

Bacillus fusiformis

Authors: (ex Meyer and Gottheil 1901) Priest et al. 1989
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:93 [Literature]
Comment: basonym "*Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*"
Type strain: ATCC 7055, DSM 2898
Synonym(s): *Lysinibacillus fusiformis*

Bacillus galactophilus

Authors: Takagi et al. 1993
Status: sp. nov. (VP), heterotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:229* [Literature]
Comment: synonymy: IJSB 44:172*
Type strain: JCM 8507, NRRL NRS-616
Synonym(s): *Brevibacillus agri*; *Bacillus agri*

Bacillus galactosidilyticus

Authors: Heyndrickx et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:620* [Literature]
Type strain: DSM 15595, LMG 17892, Logan B2188, MB 800

Bacillus galliciensis

Authors: Balcázar et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:894* [Literature]
Type strain: BFLP-1, DSM 21539, LMG 24668

Bacillus gelatini

Authors: De Clerck et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:945* [Literature]
Type strain: DSM 15865, LMG 21880
Synonym(s): *Fictibacillus gelatini*

Bacillus gibsonii

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8722, PN-109

Bacillus ginsengi

Authors: Qiu et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:733* [Literature]
Type strain: ge14, CGMCC 1.6763, DSM 19038
Synonym(s): *Bhargavaea ginsengi*

Bacillus ginsengihumi

Authors: Ten et al. 2007
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1371 [Literature]
Type strain: Gsoil 114, KCTC 13944, DSM 18134

Bacillus ginsengisoli

Authors: Nguyen et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:859* [Literature]
Type strain: DCY53, JCM 17335, KCTC 13945

Bacillus globisporus

Authors: Larkin and Stokes 1967
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 23301, CCM 2119, DSM 4, NCIB 11434
Synonym(s): *Sporosarcina globispora*; *Bacillus globisporus* subsp. *globisporus*

Bacillus globisporus* subsp. *globisporus

Authors: (Larkin and Stokes 1967) Rügner and Richter 1979
Status: subspecies (AL), homotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: W 25, DSM 4, ATCC 23301, NCIMB 11434, CCM 2119, CIP 103266
Synonym(s): *Sporosarcina globispora*; *Bacillus globisporus*

Bacillus globisporus* subsp. *marinus

Authors: Rügner and Richter 1979
Status: subspecies (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:256 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 29841, DSM 1297
Synonym(s): *Jeotgalibacillus marinus*; *Bacillus marinus*; *Marinibacillus marinus*

Bacillus glucanolyticus

Authors: Alexander and Priest 1989
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:113* [Literature]
Type strain: DSM 5162, NCIMB 12809, S93
Synonym(s): *Paenibacillus glucanolyticus*

Bacillus gordonae

Authors: Pichinoty et al. 1987
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 37:179 [Literature]
Synonym(s): *Paenibacillus validus*; *Bacillus validus*; *Paenibacillus gordonae*

Bacillus gottheilii

Authors: Seiler et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:871* [Literature]
Type strain: WCC 4585, CCUG 59876, DSM 23668, LMG 25856

Bacillus graminis

Authors: Bibi et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1570* [Literature]
Type strain: YC6957,DSM 22162,KACC 13779

Bacillus halmapalus

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8723,PN-118

Bacillus haloalkaliphilus

Authors: Fritze 1996
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:100* [Literature]
Type strain: DSM 5271,WN13
Synonym(s): *Alkalibacillus haloalkaliphilus*

Bacillus halochares

Authors: Pappa et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1435* [Literature]
Type strain: MSS4,LMG 24571,DSM 21373

Bacillus halodenitrificans

Authors: Denariáz et al. 1989
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:150* [Literature]
Type strain: ATCC 49067,DSM 10037
Synonym(s): *Virgibacillus halodenitrificans*

Bacillus halodurans

Authors: (ex Boyer 1973) Nielsen et al. 1995
Status: nom. rev., comb. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Comment: basonym "*Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans*"
Type strain: ATCC 27557,DSM 497,NRRL B-3881,PN-80
Synonym(s): "*Bacillus alcalophilus*" subsp. *halodurans*

Bacillus halophilus

Authors: Ventosa et al. 1990
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 40:105 [Literature]
Type strain: ATCC 49085,CCM 4074,DSM 4771,N23-2
Synonym(s): *Salimicrobium halophilum*

Bacillus halosaccharovorans

Authors: Mehrshad et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:2780* [Literature]
Type strain: E33,IBRC-M 10095,DSM 25387

Bacillus hemicellulosilyticus

Authors: Nogi et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2314* [Literature]
Type strain: C-11,DSM 16731,JCM 9152

Bacillus hemicentroti

Authors: Chen et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:2953* [Literature]
Type strain: JSM 076093,DSM 23007,KCTC 13710

Bacillus herbersteinensis

Authors: Wieser et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2122* [Literature]
Type strain: CCM 7228,D-1,5a,DSM 16534

Bacillus horikoshii

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8719,PN-121

Bacillus horneckiae

Authors: Vaishampayan et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1036* [Literature]
Type strain: 1P01SC,MTCC 9535,NRRL B-59162

Bacillus horti

Authors: Yumoto et al. 1998
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 48:570* [Literature]
Type strain: DSM 12751,JCM 9943,K13

Bacillus huizhouensis

Authors: Li et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:3603 [Literature]
Type strain: GSS03,CCTCC AB 2013237,KCTC 33172

Bacillus humi

Authors: Heyrman et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:116* [Literature]
Type strain: DSM 16318,LMG 22167

Bacillus hwajinpoensis

Authors: Yoon et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:807* [Literature]
Type strain: JCM 11807,KCCM 41641,SW-72

Bacillus idriensis

Authors: Ko et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2543* [Literature]
Type strain: SMC 4352-2,KCCM 90024,JCM 13437

Bacillus indicus

Authors: Suresh et al. 2004 emend. Stropko et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1374* [Literature]
Comment: emended description: IJSEM 64:3807/8*
Type strain: DSM 15820, MTCC 4374, Sd/3, LMG 22858
Synonym(s): *Bacillus cibi* (heterotypic syn.)

Bacillus infantis

Authors: Ko et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2543* [Literature]
Type strain: SMC 4352-1, KCCM 90025, JCM 13438

Bacillus infernus

Authors: Boone et al. 1995
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:447* [Literature]
Type strain: DSM 10277, OCM 479, SMCC W479, TH-23

Bacillus insolitus

Authors: Larkin and Stokes 1967
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 23299, CCM 2175, DSM 5, NCIB 11433
Synonym(s): *Psychrobacillus insolitus*

Bacillus invictae

Authors: Branquinho et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:3875* [Literature]
Type strain: BiFFUP1, Bi_{FFUP1}, DSM 26896, CCUG 64113

Bacillus iranensis

Authors: Bagheri et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:814* [Literature]
Type strain: X5B, DSM 23995, IBRC 10446

Bacillus isabeliae

Authors: Albuquerque et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:229* [Literature]
Type strain: CVS-8, CIP 108578, LMG 22838

Bacillus isronensis

Authors: Shivaji et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2983* [Literature]
Type strain: B3W22, JCM 13838, MTCC 7902, DSM 21046

Bacillus jeotgali

Authors: Yoon et al. 2001
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1091* [Literature]
Type strain: JCM 10885, KCCM 41040, YKJ-10

Bacillus kaustophilus

Authors: (ex Prickett 1928) Priest et al. 1989
Status: sp. nov., nom. rev. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:93 [Literature]
Type strain: ATCC 8005, DSM 7263, NRS 7281
Synonym(s): *Geobacillus kaustophilus*

Bacillus kobensis

Authors: Kanzawa et al. 1995
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:517* [Literature]
Type strain: DSM 10249, IFO 15729, YK205
Synonym(s): *Paenibacillus kobensis*

Bacillus kochii

Authors: Seiler et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:1096* [Literature]
Type strain: WCC 4582, CCUG 59877, DSM 23667, LMG 25855

Bacillus kokeshüiformis

Authors: Poudel et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2673* [Literature]
Type strain: MO-04, JCM 19325, KCTC 33163

Bacillus koreensis

Authors: Lim et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:62* [Literature]
Type strain: BR030, DSM 16467, KCTC 3914

Bacillus korlensis

Authors: Zhang et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1791* [Literature]
Type strain: ZLC-26, CCTCC AB 207172, NRRL B-51302

Bacillus kribbensis

Authors: Lim et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2915* [Literature]
Type strain: BT080, KCTC 13934, DSM 17871

Bacillus krulwichiae

Authors: Yumoto et al. 2003
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1536* [Literature]
Type strain: AM31D, IAM 15000, JCM 11691, NCIMB 13904

Bacillus laevolacticus

Authors: (ex Nakayama and Yanoshi 1967) Andersch et al. 1994
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 44:663* [Literature]
Type strain: ATCC 23492, DSM 442, IAM 12321, M 8, NCIB 10269
Synonym(s): *Sporolactobacillus laevolacticus*

Bacillus larvae

Authors: White 1906
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 9545, DSM 7030
Synonym(s): *Paenibacillus larvae*; *Bacillus pulvifaciens*;
Paenibacillus larvae subsp. *larvae*
Paenibacillus larvae subsp. *pulvifaciens*; *Paenibacillus pulvifaciens*

Bacillus laterosporus

Authors: Laubach 1916
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 64, CCM 2116, DSM 25, NCIB 9367, NCTC 6357
Synonym(s): *Brevibacillus laterosporus*

Bacillus lautus

Authors: Nakamura 1984
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:225* [Literature]
Type strain: DSM 3035, NRRL NRS 666
Synonym(s): *Paenibacillus lautus*

Bacillus lehensis

Authors: Ghosh et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:241* [Literature]
Type strain: MLB2, MTCC 7633, JCM 13820

Bacillus lentimorbis

Authors: Dutky 1940
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14707
Synonym(s): *Paenibacillus lentimorbis*

Bacillus lentus

Authors: Gibson 1935
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 10840, CCM 2214, DSM 9, NCIB 8773, NCTC 4824

Bacillus licheniformis

Authors: (Weigmann 1898) Chester 1901
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14580, CCM 2145, DSM 13, IFO 12200, NCIB 9375, NCTC 10341

Bacillus ligniniphilus

Authors: Zhu et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1717* [Literature]
Type strain: L1, JCM 18543, DSM 26145

Bacillus litoralis

Authors: Yoon and Oh 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1947* [Literature]
Type strain: DSM 16303, KCTC 3898, SW-211

Bacillus locisalis

Authors: Márquez et al. 2011
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:2563 [Literature]
Type strain: DSM 18085, CG1, CGMCC 1.6286, CECT 7152, CCM 7370

Bacillus luciferensis

Authors: Logan et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1988* [Literature]
Type strain: CIP 107105, LMG 18422, SSI061

Bacillus luteolus

Authors: Shi et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1348* [Literature]
Type strain: YIM 93174, CCTCC AA 208068, DSM 22388, KCTC 13210

Bacillus luteus

Authors: Subhash et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1584* [Literature]
Type strain: JC167, KCTC 33100, LMG 27257

Bacillus macauensis

Authors: Zhang et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:352* [Literature]
Type strain: DSM 17262, JCM 13285, ZFHKF-1
Synonym(s): *Fictibacillus macauensis*

Bacillus macerans

Authors: Schardinger 1905
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 8244, CCM 2012, DSM 24, IAM 1227, NCIB 9368, NCTC 6355
Synonym(s): *Paenibacillus macerans*

Bacillus macquariensis

Authors: Marshall and Ohye 1966
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 23464, DSM 2, NCIB 9934, NCTC 10419
Synonym(s): *Paenibacillus macquariensis* subsp. *macquariensis*; *Paenibacillus macquariensis*

Bacillus macyae

Authors: Santini et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2244* [Literature]
Type strain: DSM 16346, JCM 12340, JMM-4
Synonym(s): “*Anaerobacillus macyae*”

Bacillus malacitensis

Authors: Ruiz-García et al. 2005
Status: sp. nov. (VP), heterotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1284* [Literature]
Comment: later heterotypic synonym of *Bacillus mojavensis*
Type strain: CECT 5687,CR-95,LMG 22477
Synonym(s): *Bacillus mojavensis*; *Bacillus axarquiensis*

Bacillus mannanilyticus

Authors: Nogi et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2314* [Literature]
Type strain: AM-001,DSM 16130,JCM 10596

Bacillus marinus

Authors: (Rüger and Richter 1979) Rüger 1983 emend. Rüger et al. 2000
Status: comb. nov. (VP), homotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 33:159* [Literature]
Comment: emended description: IJSEM 50:1310*
Type strain: ATCC 29841,DSM 1297
Synonym(s): *Jeotgalibacillus marinus*; *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*; *Marinibacillus marinus*

Bacillus marisflavi

Authors: Yoon et al. 2003
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1302* [Literature]
Type strain: JCM 11544,KCCM 41588,TF-11

Bacillus marismortui

Authors: Arahal et al. 1999
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 49:529* [Literature]
Type strain: 123,ATCC 700626,CECT 5066,CIP 105609,DSM 12325
Synonym(s): *Virgibacillus marismortui*; *Salibacillus marismortui*

Bacillus marmarensis

Authors: Denizci et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1593* [Literature]
Type strain: GMBE 72,DSM 21297,JCM 15719

Bacillus massiliensis

Authors: Glazunova et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1487* [Literature]
Type strain: 4400831,CCUG 49529,CIP 108446
Synonym(s): *Lysinibacillus massiliensis*

Bacillus megaterium

Authors: de Bary 1884
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14581,CCM 2007,DSM 32,NCIB 9376,NCTC 10342

Bacillus mesonae

Authors: Liu et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:3350* [Literature]
Type strain: FJAT-13985,DSM 25968,CGMCC 1.12238

Bacillus methanolicus

Authors: Arfiman et al. 1992
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 42:444* [Literature]
Type strain: NCIMB 13113,PB1

Bacillus methylophilicus

Authors: Madhaiyan et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:2494* [Literature]
Type strain: CBMB205,KACC 13105,NCCB 100236

Bacillus migulanus

Authors: Takagi et al. 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:229* [Literature]
Type strain: ATCC 9999,DSM 2895,JCM 8504
Synonym(s): *Aneurinibacillus migulanus*

Bacillus mojavensis

Authors: Roberts et al. 1994 emend. Wang et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 44:263* [Literature]
Type strain: DSM 9205,NRRL B-14698,RO-H-1,LMG 17797,CIP 104095,ATCC 51516,BCRC 17124,NBRC 15718
Synonym(s): *Bacillus axarquiensis* (heterotypic syn.); *Bacillus malacitensis* (heterotypic syn.)

Bacillus mucilaginosus

Authors: Avakyan et al. 1998
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 48:631 [Literature]
Type strain: 1480D,VKPM B-7519
Synonym(s): *Paenibacillus mucilaginosus*

Bacillus muralis

Authors: Heyrman et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:129* [Literature]
Type strain: DSM 16288,LMG 20238

Bacillus murimartini

Authors: Borchert et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2892* [Literature]
Type strain: LMG 21005,NCIMB 14102

Bacillus mycoides

Authors: Flügge 1886
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 6462,DSM 2048

Bacillus naganensis

Authors: Tomimura et al. 1990
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 40:124* [Literature]
Type strain: ATCC 53909, DSM 10191, LMG 12887
Synonym(s): *Pullulanibacillus naganensis*

Bacillus nanhaiensis

Authors: Chen et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:892* [Literature]
Type strain: JSM 082006, DSM 23009, KCTC 13712
Synonym(s): *Fictibacillus nanhaiensis*

Bacillus nanhaiisediminis

Authors: Zhang et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1081* [Literature]
Type strain: NH3, CGMCC 1.10116, JCM 16507

Bacillus nealsonii

Authors: Venkateswaran et al. 2003
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:171* [Literature]
Type strain: ATCC BAA-519, DSM 15077, FO-92

Bacillus neidei

Authors: Nakamura et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:504* [Literature]
Type strain: JCM 11077, NRRL BD-87
Synonym(s): *Viridibacillus neidei*

Bacillus neizhouensis

Authors: Chen et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:3038* [Literature]
Type strain: JSM 071004, CCTCC AB 207161, DSM 19794, KCTC 13187

Bacillus niabensis

Authors: Kwon et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1912* [Literature]
Type strain: 4T19, KACC 11279, DSM 17723

Bacillus niacini

Authors: Nagel and Andreesen 1991
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 41:137* [Literature]
Type strain: DSM 2923

Bacillus novalis

Authors: Heyrman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:54* [Literature]
Type strain: DSM 15603, IDA3307, LMG 21837, R-15439

Bacillus oceanisediminis

Authors: Zhang et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:2928* [Literature]
Type strain: H2, CGMCC 1.10115, JCM 16506

Bacillus odysseyi

Authors: La Duc et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:200* [Literature]
Type strain: 34hs-1, ATCC PTA-4993, NBRC 100172, NRRL B-30641
Synonym(s): *Lysinibacillus odysseyi*

Bacillus okhensis

Authors: Nowlan et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1076* [Literature]
Type strain: ATCC BAA-1137, JCM 13040, Kh10-101

Bacillus okuhidensis

Authors: Li et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1208* [Literature]
Type strain: DSM 13666, GTC 854, JCM 10945

Bacillus oleronius

Authors: Kuhnigk et al. 1996 emend. Heyndrickx et al. 2012
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:625 [Literature]
Comment: emended description: IJSEM 62:313*
Type strain: DSM 9356, Rt 10, LMG 17952

Bacillus oryzaecorticis

Authors: Hong et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2790* [Literature]
Type strain: R1, KACC 17217, KCCM 90231, JCM 19602

Bacillus oshimensis

Authors: Yumoto et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:910* [Literature]
Type strain: JCM 12663, K11, NCIMB 14023

Bacillus pabuli

Authors: Nakamura 1984
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:225* [Literature]
Type strain: DSM 3036, NRRL NRS 924
Synonym(s): *Paenibacillus pabuli*

Bacillus pakistanensis

Authors: Roohi et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2927 [Literature]
Type strain: NCCP-168, DSM 24834, KCTC 13786

Bacillus pallidus

Authors: Scholz et al. 1988
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 38:136 [Literature]
Type strain: DSM 3670,H12
Synonym(s): *Aeribacillus pallidus*; *Geobacillus pallidus*

Bacillus pallidus (illeg.)

Authors: Zhou et al. 2008
Status: sp. nov. (VP), illegitimate name
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2853* [Literature]
Type strain: CW 7,CCTCC AB 207188,KCTC 13200,LMG 24451
Synonym(s): *Falsibacillus pallidus*

Bacillus panacisoli

Authors: Choi and Cha 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:905* [Literature]
Type strain: CJ32,KACC 17503,JCM 19226

Bacillus panaciterrae

Authors: Ten et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2864* [Literature]
Type strain: Gsoil 1517,KCTC 13929,CCUG 52470,LMG 23408

Bacillus pantothenicus

Authors: Proom and Knight 1950
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14576,CCM 2049,DSM 26,NCIB 8775,NCTC 8162
Synonym(s): *Virgibacillus pantothenicus*

Bacillus parabrevis

Authors: Takagi et al. 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:229* [Literature]
Type strain: ATCC 10027,DSM 8376,IFO 12334,JCM 8506
Synonym(s): *Brevibacillus parabrevis*

Bacillus paraflexus

Authors: Chandna et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:4741* [Literature]
Type strain: RC2,MTCC 9831,MCC 2100,KCTC 13724,CCM 7754

Bacillus pasteurii

Authors: (Miquel 1889) Chester 1898
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 11859,CCM 2056,DSM 33,NCIB 8841,NCTC 4822
Synonym(s): *Sporosarcina pasteurii*

Bacillus patagoniensis

Authors: Olivera et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:446* [Literature]
Type strain: ATCC BAA-965,DSM 16117,PAT 05

Bacillus peoriae

Authors: Montefusco et al. 1993
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 43:389* [Literature]
Type strain: BD-57,DSM 8320,NRRL B-14750
Synonym(s): *Paenibacillus peoriae*

Bacillus persepolensis

Authors: Amoozegar et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2355* [Literature]
Type strain: HS136,CCM 7595,DSM 21632,JCM 15720,LMG 25222
Synonym(s): *Alteribacillus persepolensis*

Bacillus persicus

Authors: Didari et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:1233* [Literature]
Type strain: B48,B48 (2010),CECT 8001,DSM 25386,IBRC-M 10115

Bacillus pervagus

Authors: Kosowski et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:93* [Literature]
Type strain: 8-4-E12,DSM 23947,LMG 27601

Bacillus plakortidis

Authors: Borchert et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2892* [Literature]
Type strain: P203,DSM 19153,NCIMB 14288

Bacillus pocheonensis

Authors: Ten et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2536* [Literature]
Type strain: Gsoil 420,KCTC 13943,DSM 18135

Bacillus polygoni

Authors: Aino et al. 2008
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:123* [Literature]
Type strain: YN-1,NCIMB 14282,JCM 14604

Bacillus polymachus

Authors: Nguyen and Kim 2015
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:708* [Literature]
Type strain: T515,KEMB 9005-168,KACC 18242,NBRC 110614

Bacillus polymyxa

Authors: (Prazmowski 1880) Mace 1889
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 842,CCM 1459,DSM 36,NCIB 8158,NCTC 10343
Synonym(s): *Paenibacillus polymyxa*

Bacillus popilliae

Authors: Dutky 1940
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14706
Synonym(s): *Paenibacillus popilliae*

Bacillus pseudocaliphilus

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8725,PN-137

Bacillus pseudofirmus

Authors: Nielsen et al. 1995
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:879 [Literature]
Type strain: DSM 8715,NCIMB 10283,PN-3

Bacillus pseudomycooides

Authors: Nakamura 1998
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 48:1035* [Literature]
Type strain: DSM 12442,NRRL B-617

Bacillus psychrodurans

Authors: Abd El-Rahman et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:2132* [Literature]
Type strain: 68E3,DSM 11713,NCIMB 13837
Synonym(s): *Psychrobacillus psychrodurans*

Bacillus psychrophilus

Authors: Nakamura 1984
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:122* [Literature]
Type strain: ATCC 23304,CCM 2117,DSM 3,NRRL NRS 1530
Synonym(s): *Sporosarcina psychrophila*

Bacillus psychrosaccharolyticus

Authors: (ex Larkin and Stokes 1967) Priest et al. 1989
Status: sp. nov., nom. rev. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:93 [Literature]
Type strain: ATCC 23296,DSM 6,NCIB 11729

Bacillus psychrotolerans

Authors: Abd El-Rahman et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:2131* [Literature]
Type strain: 3H1,DSM 11706,NCIMB 13838
Synonym(s): *Psychrobacillus psychrotolerans*

Bacillus pulvifaciens

Authors: Nakamura 1984
Status: sp. nov. (VP), heterotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:412* [Literature]
Type strain: DSM 3615,NRRL B-3685
Synonym(s): *Paenibacillus larvae*; *Bacillus larvae*; *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*
Paenibacillus larvae subsp. *pulvifaciens*; *Paenibacillus pulvifaciens*

Bacillus pumilus

Authors: Meyer and Gottheil 1901
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 7061,CCM 2144,DSM 27,NCIB 9369,NCTC 10337

Bacillus purgationiresistens

Authors: corrig. Vaz-Moreira et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:76* [Literature]
Comment: the original spelling of the specific epithet, *purgationiresistans* (*sic*), has been corrected on notification
Type strain: DS22,DSM 23494,LMG 25783,NRRL B-59432
Synonym(s): “*Bacillus purgationiresistans*” (orthographically incorrect name)

Bacillus pycnus

Authors: Nakamura et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:504* [Literature]
Type strain: JCM 11075,NRRL NRS-1691
Synonym(s): *Rummeliibacillus pycnus*

Bacillus qingdaonensis

Authors: Wang et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1146* [Literature]
Type strain: CM1,CGMCC 1.6134,JCM 14087

Bacillus qingshengii

Authors: Xi et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2478* [Literature]
Type strain: G19,CTCC AB 2013273,JCM 19454

Bacillus reuszeri

Authors: Shida et al. 1995
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:98* [Literature]
Type strain: DSM 9887,IFO 15719,JCM 9170,NRRL NRS-1206
Synonym(s): *Brevibacillus reuszeri*

Bacillus rhizosphaerae

Authors: Madhaiyan et al. 2013
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:1 [Literature]
Type strain: SC-N012,DSM 21911,NCCB 100267

Bacillus rigui

Authors: Baik et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:2208* [Literature]
Type strain: WPCB074,KCTC 13278,JCM 16348
Synonym(s): *Fictibacillus rigui*

Bacillus ruris

Authors: Heyndrickx et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2553* [Literature]
Type strain: DSM 17057,LMG 22866,Logan B3037,MB 1669

Bacillus safensis

Authors: Satomi et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1739* [Literature]
Type strain: FO-36b,ATCC BAA-1126,NBRC 100820

Bacillus salarius

Authors: Lim et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:376* [Literature]
Type strain: BH169,DSM 16461,KCTC 3912

Bacillus salexigens

Authors: Garabito et al. 1997
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 47:739* [Literature]
Type strain: ATCC 700290,C-20Mo,CCM 4646,DSM 11483
Synonym(s): *Virgibacillus salexigens*; *Salibacillus salexigens*

Bacillus saliphilus

Authors: Romano et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:162* [Literature]
Type strain: 6AG,ATCC BAA-957,DSM 15402

Bacillus salsus

Authors: Amoozegar et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3328* [Literature]
Type strain: A24,IBRC-M 10078,KCTC 13816

Bacillus schlegelii

Authors: Schenk and Aragno 1981
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 31:215 [Literature]
Type strain: DSM 2000,LMG 7133
Synonym(s): *Hydrogenibacillus schlegelii*

Bacillus sediminis

Authors: Yu et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:3603 [Literature]
Type strain: DX-5,CGMCC 1.12412,KCTC 33102

Bacillus selenatarsenatis

Authors: Yamamura et al. 2007
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1063* [Literature]
Type strain: SF-1,JCM 14380,DSM 18680

Bacillus selenitireducens

Authors: Switzer Blum et al. 2001
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:793 [Literature]
Type strain: ATCC 700615,MLS10

Bacillus seohaeanensis

Authors: Lee et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1896* [Literature]
Type strain: BH 724,KCTC 3913,DSM 16464

Bacillus shacheensis

Authors: Lei et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:3603 [Literature]
Type strain: HNA-14,DSM 26902,KCTC 33145,SCULCB HNA-14

Bacillus shackletonii

Authors: Logan et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:375* [Literature]
Type strain: CIP 107762,LMG 18435,Logan collection number B1724,SSI024

Bacillus siamensis

Authors: Sumpavapol et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:2369* [Literature]
Type strain: PD-A10,BCC 22614,KCTC 13613

Bacillus silvestris

Authors: Rheims et al. 1999
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 49:800* [Literature]
Type strain: DSM 12223,HR3-23
Synonym(s): *Solibacillus silvestris*

Bacillus simplex

Authors: Priest et al. 1989 emend. Heyrman et al. 2005
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:93 [Literature]
Type strain: ATCC 49097,DSM 1321,NRS 960

Bacillus sivalis

Authors: Pettersson et al. 2000
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:2186* [Literature]
Type strain: 171544,CIP 106295,DSM 13140,NCIMB 13601

Bacillus smithii

Authors: Nakamura et al. 1988
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 38:63* [Literature]
Type strain: DSM 4216, NRRL NRS 173, NRRL NRS-17

Bacillus soli

Authors: Heyrman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:55* [Literature]
Type strain: DSM 15604, IDA0086, LMG 21838, R-16300

Bacillus solimangrovi

Authors: Lee et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1627* [Literature]
Type strain: GH2-4, KCTC 33142, JCM 18994, DSM 27083

Bacillus solisalsi

Authors: Liu et al. 2009
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1463* [Literature]
Type strain: YC1, CGMCC 1.6854, KCTC 13181
Synonym(s): *Fictibacillus solisalsi*

Bacillus songklensis

Authors: Kang et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:4194* [Literature]
Type strain: CAU 1033, KCTC 13881, CCUG 61889

Bacillus sonorensis

Authors: Palmisano et al. 2001
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1678* [Literature]
Type strain: DSM 13779, L87-10, NRRL B-23154

Bacillus sphaericus

Authors: Meyer and Neide 1904
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 14577, CCM 2120, DSM 28, NCIB 9370, NCTC 10338
Synonym(s): *Lysinibacillus sphaericus*

Bacillus sporothermodurans

Authors: Petterson et al. 1996 emend. Heyndrickx et al. 2012
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:763* [Literature]
Comment: emended description: IJSEM 62:312*
Type strain: DSM 10599, M215, MB 581, LMG 17668, LMG 17894

Bacillus stearothermophilus

Authors: Donk 1920
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:257 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 12980, DSM 22
Synonym(s): *Geobacillus stearothermophilus*

Bacillus stratosphericus

Authors: Shivaji et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1471* [Literature]
Type strain: 41KF2a, JCM 13349, MTCC 7305

Bacillus subterraneus

Authors: Kanso et al. 2002
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:873* [Literature]
Type strain: ATCC BAA-136, COOI3B, DSM 13966

Bacillus subtilis

Authors: (Ehrenberg 1835) Cohn 1872
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:258 (AL)
Comment: divided into subspecies

Bacillus subtilis subsp. inaquosorum

Authors: Rooney et al. 2009
Status: subsp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2435* [Literature]
Type strain: BGSC 3A28, KCTC 13429, NRRL B-23052; *subtilis* subsp. *spizizenii*

Bacillus subtilis subsp. spizizenii

Authors: Nakamura et al. 1999
Status: subsp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1214* [Literature]
Type strain: NRRL B-23049

Bacillus subtilis subsp. subtilis

Authors: (Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999
Status: subsp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1214* [Literature]
Comment: subspecies automatically created according to Rule 46
Type strain: ATCC 6051, CCM 2216, DSM 10, IFO 13719, IMET 10758, NCIB 3610, NCTC 3610, NRRL NRS-744
Synonym(s): “*Bacillus natto*”

Bacillus taeenanensis

Authors: Lim et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2905* [Literature]
Type strain: BH030017, KCTC 3918, DSM 16466; *tequilensis*

Bacillus tequilensis

Authors: Gatson et al. 2006
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1481* [Literature]
Type strain: 10b, ATCC BAA-819, NCTC 13306

Bacillus thermantarcticus

Authors: corrig. Nicolaus et al. 2002
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:3 [Literature]
Comment: nom. corrig.: *Bacillus thermoantarcticus* (sic)
Type strain: DSM 9572, M1
Synonym(s): *Geobacillus thermantarcticus*; *Bacillus thermoantarcticus*

Bacillus thermoaerophilus

Authors: Meier-Staufffer et al. 1996
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:540* [Literature]
Type strain: DSM 10154,L420-91
Synonym(s): *Aneurinibacillus thermoaerophilus*

Bacillus thermoamylovorans

Authors: Combet-Blanc et al. 1995 emend. Coorevits et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 45:15* [Literature]
Comment: emended description: IJSEM 61:1960*
Type strain: CNCM I-1378,DKP,LMG 18084

Bacillus thermoantarcticus

Authors: Nicolaus et al. 2002
Status: orthographically incorrect name
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:3
Synonym(s): *Geobacillus thermantarcticus*; *Bacillus thermantarcticus*

Bacillus thermocatenulatus

Authors: Golovacheva 1991
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 41:178 [Literature]
Type strain: 178,DSM 730,VKM B-1259
Synonym(s): *Geobacillus thermocatenulatus*; *Geobacillus gargensis*

Bacillus thermocloacae

Authors: Demharter and Hensel 1989
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 39:495 [Literature]
Comment: misspelled "thermocloacae" in the title of effective publication and List No. 31
Type strain: DSM 5250,S6025

Bacillus thermocopriae

Authors: Han et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3028* [Literature]
Type strain: SgZ-7,CCTCC AB 2012030,KACC 16700

Bacillus thermodenitrificans

Authors: (ex Klaushofer and Hollaus 1970) Manachini et al. 2000
Status: sp. nov., nom. rev. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1336* [Literature]
Type strain: DSM 465
Synonym(s): *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *thermodenitrificans*
Geobacillus thermodenitrificans

Bacillus thermoglucosidasius

Authors: Suzuki 1984
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:270 [Literature]
Type strain: DSM 2542,KP 1006,NCIB 11955
Synonym(s): *Geobacillus thermoglucosidasius*

Bacillus thermolactis

Authors: Coorevits et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1960* [Literature]
Type strain: R-6488,DSM 23332,LMG 25569

Bacillus thermoleovorans

Authors: Zarilla and Perry 1988
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 38:220 [Literature]
Type strain: ATCC 43513,DSM 5366,LEH-1
Synonym(s): *Geobacillus thermoleovorans*

Bacillus thermophilus

Authors: Yang et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3035* [Literature]
Type strain: SgZ-10,CCTCC AB 2012110,KACC 16873

Bacillus thermoruber

Authors: Manachini et al. 1985
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 35:493* [Literature]
Type strain: BT2,DSM 7064,MIM 30.8.38
Synonym(s): *Brevibacillus thermoruber*

Bacillus thermosphaericus

Authors: Andersson et al. 1996
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:362 [Literature]
Type strain: DSM 10633,HAMBI 1900,P-11
Synonym(s): *Ureibacillus thermosphaericus*

Bacillus thermotolerans

Authors: Yang et al. 2013
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3677* [Literature]
Type strain: SgZ-8,CCTCC AB 2012108,KACC 16706

Bacillus thiaminolyticus

Authors: Nakamura 1990
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 40:245* [Literature]
Type strain: DSM 7262,NRRL B-4156
Synonym(s): *Paenibacillus thiaminolyticus*

Bacillus thioparans

Authors: corrig. Pérez-Ibarra et al. 2007
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1933 [Literature]
Type strain: IIBM-UNAM BM-B-436,CECT 7196
Synonym(s): "*Bacillus thioparus*" (orthographically incorrect name)

Bacillus thuringiensis

Authors: Berliner 1915
Status: species (AL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 30:258 (AL) [Literature]
Type strain: ATCC 10792,DSM 2046

Bacillus tianshenii

Authors: Jiang et al. 2014
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2002* [Literature]
Type strain: YIM M13235, DSM 25879, KCTC 33044

Bacillus toyonensis

Authors: Jiménez et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:2 [Literature]
Type strain: BCT-7112, CECT 876, NCIMB 14858

Bacillus tryoxylicola

Authors: Aizawa et al. 2010
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:65* [Literature]
Type strain: SU1, KCTC 13244, NBRC 102646

Bacillus tusciae

Authors: Bonjour and Aragno 1985
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 35:223 [Literature]
Type strain: DSM 2912, T2
Synonym(s): *Kyrpidia tusciae*

Bacillus validus

Authors: Nakamura 1984
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 34:225* [Literature]
Type strain: DSM 3037, NRRL NRS 1000, NRRL NRS-1000
Synonym(s): *Paenibacillus validus*; *Bacillus gordonae*; *Paenibacillus gordonae*

Bacillus vallismortis

Authors: Roberts et al. 1996
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:474* [Literature]
Type strain: DSM 11031, DV1-F-3, NRRL B-14890

Bacillus vedderi

Authors: Agnew et al. 1996
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 46:362 [Literature]
Type strain: DSM 9768, JaH

Bacillus velezensis

Authors: Ruiz-García et al. 2005
Status: sp. nov. (VP), heterotypic syn.
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:195* [Literature]
Comment: *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*
Type strain: CECT 5687, CR-502, LMG 22478
Synonym(s): *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*
Bacillus amyloliquefaciens

Bacillus vietnamensis

Authors: Noguchi et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2119* [Literature]
Type strain: 15-1, JCM 11124, NRIC 0531, NRRL B-23890

Bacillus vireti

Authors: Heyrman et al. 2004
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:55* [Literature]
Type strain: DSM 15602, IDA3632, LMG 21834, R-15447

Bacillus vulcani

Authors: Caccamo et al. 2000
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:2011* [Literature]
Type strain: 3S-1, CIP 106305, DSM 13174
Synonym(s): *Geobacillus vulcani*

Bacillus wakoensis

Authors: Nogi et al. 2005
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2312* [Literature]
Type strain: DSM 2521, JCM 9140, N-1

Bacillus weihenstephanensis

Authors: Lechner et al. 1998
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Bacteriol. 48:1380* [Literature]
Type strain: DSM 11821, WSBC 10204

Bacillus xiamenensis

Authors: Lai et al. 2014
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1455 [Literature]
Type strain: HYC-10, CGMCC 1.12326, LMG 27143

Bacillus xiaoxiensis

Authors: Chen et al. 2011
Status: sp. nov. (VP)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:2099* [Literature]
Type strain: JSM 081004, CCTCC AA 208057, DSM 21943

Bacillus zhanjiangensis

Authors: Chen et al. 2012
Status: sp. nov. (VL)
Reference: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:2549 [Literature]
Type strain: JSM 099021, DSM 23010, KCTC 13713

ANEXO 34 - MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS A *Bacillus* E GÊNEROS CORRELATOS

1. Eletroforese de Proteínas de Cristais de Protoxinas em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Para se obter um perfil eletroforético das proteínas formadora de cristais de protoxinas produzidos pelas espécies de bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* utiliza-se a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, em presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Esse procedimento deve ser realizado com suspensão de esporos e cristais de proteínas de acordo com o seguinte protocolo:

- Crescer as células em meio de cultivo básico para esporulação até completar a lise celular (verificar ao microscópio a porcentagem de esporulação)
- Centrifugar 30 mL de cada espécie a 10.000 rpm durante 20 min a 10°C, e despresar o sobrenadante
- Ressuspender a biomassa de proteínas em 1 mL de água bidestilada estéril
- Concentrar 4x com tampão de amostra (25 µL de tampão em 75 µL de biomassa)
- Aquecer a 95°C durante 5 min
- Centrifugar durante 5 min, a 10.000 rpm
- Aplicar o sobrenadante das amostras no gel

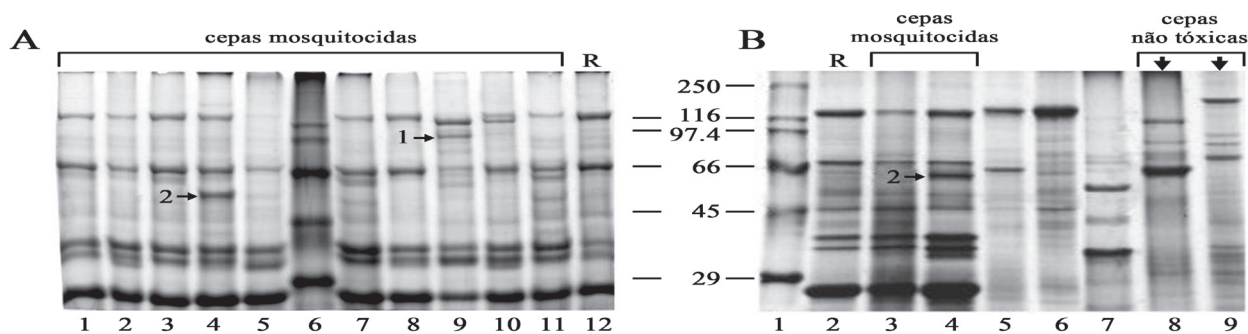


Figura 14: Perfis de proteínas de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* mosquitocidas e de cepas não tóxicas autoaglutináveis e perfis de DNA polimórficos aleatoriamente amplificados de *Bacillus thuringiensis* também autoaglutináveis, originados pelo “primer” 1. (A) Linha 1: LFB-FIOCRUZ 1035; Linha 2: LFB-FIOCRUZ 1036; Linha 3: LFB-FIOCRUZ 1037; Linha 4: LFB-FIOCRUZ 1038; Linha 5: LFB-FIOCRUZ 1039; Linha 6: Padrões de proteínas (miosina, 205 kDa; β -galactosidase, 116 kDa; fosforilase b, 97,4 kDa; albumina bovina, 66 kDa; albumina de ovo, 45 kDa; carbonicoanidrase, 29 kDa); Linha 7: LFB-FIOCRUZ 1041; Linha 8: LFB-FIOCRUZ 1042; Linha 9: LFB-FIOCRUZ 1043; Linha 10: LFB-FIOCRUZ 1044; Linha 11: LFB-FIOCRUZ 1076; Linha 12: LFB-FIOCRUZ 584 (*B. thuringiensis* sorovar *israelensis* H:14). As setas 1 e 2 mostram proteínas com peso molecular ao redor de 100 kDa e 50-55 kDa, respectivamente. (B) Linha 1: padrões de proteína como acima; Linha 2: LFB-FIOCRUZ 584; Linha 3: LFB-FIOCRUZ 894; Linha 4: LFB-FIOCRUZ 969; Linha 5: LFB-FIOCRUZ 263 (*B. thuringiensis* sorovar *kurstaki*); Linha 6: LFB-FIOCRUZ 780 (*B. thuringiensis* sorovar *morrisoni*); Linha 7: LFB-FIOCRUZ 869 (*B. thuringiensis* sorovar *brasiliensis*); Linha 8: LFB-FIOCRUZ 853; Linha 9: LFB-FIOCRUZ 1070. As setas indicam linhagens não tóxicas autoaglutinantes de *B. thuringiensis*. (R) Cepa de referência, *B. thuringiensis* sorovar *israelensis* H:14.

1.1 SOLUÇÕES EMPREGADAS

Tampão de amostra

Tris-HCl 0,5M pH6,8	2,5 mL
Solução de SDS* 10%	5,0 mL
Glicerol	5 mL
Azul de Bromofenol	2,5 mg
β- mercaptoetanol	0,5 mL
Água bidestilada ou equivalente	qsp 25 mL
*Dodecil Sulfato de Sódio	

- ⇒ Adicione todos os componentes da solução com exceção do β- mercaptoetanol
- ⇒ Complete o volume para 25 mL e armazene a solução em alíquotas de 1 mL em congelador (10°C)
- ⇒ Ao utilizar a alíquota, adicionar 50 μL de β- mercaptoetanol

Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30%/0,8%)

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
Água destilada ou equivalente	qsq 100 mL

- ⇒ Filtrar em papel de filtro 'Whatmam n°1' e estocar em frasco escuro
- ⇒ Guardar em refrigerador.

Solução de persulfato de amônio (APS) 10%

- ⇒ A solução tem que ser preparada no momento do uso
- ⇒ Preparar 500 μL da solução APS 10%.

Tetrametil etilenodiamino (Temed) - Sigma

- ⇒ Armazenar na temperatura ambiente

Solução de SDS 20%

- ⇒ Pesar 20 g de SDS e dissolver em até 100 mL de água bidestilada
- ⇒ Armazenar na temperatura ambiente.

Preparação do gel

- ⇒ É utilizado um sistema descontínuo composto de um gel concentrador (5%) e um gel separador (12%).

Tabela 9 - Demonstração da composição de cada gel

SOLUÇÕES	Volume do gel separador a 12%	Volume do gel concentrador a 5%
Água bidestilada	3,3 mL	0,57 mL
Solução Acrilamida 30% (p/v) e Bisacrilamida 0,8% (p/v)	4,0 mL	0,17 mL
Tris-HCL 1,5 M pH 8,0	2,5 mL	-----
Tris-HCL 0,5M pH 6,8	-----	0,25 mL
SDS 20% (P/V)	0,050 mL	0,005 mL
APS 10% (p/v)	0,100 mL	0,010 mL
Temed	0,010 mL	0,001 mL
Volume final	10 mL	1 mL

Tris-HCL 0,5M pH 6,8 *staging gel*- gel concentrador

- ⇒ Dissolver 7,475 g de Tris-base em 80 mL de água bidestilada e titule com HCL concentrado até alcançar o pH 6,8
- ⇒ Complete o volume para 100 mL e filtre a solução
- ⇒ Armazenar em refrigerador.

Tris-HCL 3,0M pH8,8 *resolving gel*- gel separador

- ⇒ Dissolver 36,6 g de Tris-base em 40 mL de água bidestilada e titular com HCL concentrado até alcançar o pH 8,8
- ⇒ Complete o volume para 100 mL e filtre a solução
- ⇒ Armazenar em refrigerador.

Tampão de corrida- solução e estoque 5x concentrado

	g/L
Trisma-base	15
Glicina	72
SDS	5
Água bidestilada	qsp

- ⇒ Acertar o pH 8,3 com HCl concentrado
- ⇒ Armazenar na temperatura ambiente.

Solução de fixação

Metanol 50%	227 mL
Ácido acético glacial	46 mL
Água destilada ou equivalente	227 mL
Volume final	500

- ⇒ Armazenar na temperatura ambiente.

Solução de coloração

- ⇒ Comassie BB R- 250 0,25% em solução de fixação (0,25 g em 100 mL da solução de fixação)
- ⇒ Armazenar na temperatura ambiente.

Solução de descoloração

Metanol	50 mL
Ácido acético glacial	75 mL
Água destilada ou equivalente	875 mL
Volume final	1000 mL

- ⇒ Armazenar na temperatura ambiente

Solução de secagem de gel

	mL
Glicerol	5
Metanol	500
Água destilada	qsp 1000

☞ Armazenar na temperatura ambiente.

2. EXTRAÇÃO DE DNA DE *B. cereus* SENSO LATO ATRAVÉS DE LISE TÉRMICA⁴³

A partir de culturas em meio líquido:

- As amostras podem ser cultivadas em 5 mL de Caldo Trypticase Soy Broth (TSB) a 37°C, por 24 h sob agitação
- Após a incubação, 1 mL desta cultura deve ser centrifugado por 4 min a 2500 x g
- O sobrenadante deve ser descartado e o sedimento lavado três vezes em 1 mL de tampão 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,8 (TE) e ressuspensão em 100 µL deste mesmo tampão
- Esta suspensão deve, então, ser mantida à temperatura de 100°C por 10 min e em seguida centrifugada por 30 s a 9000 x g, a 4°C

A partir de culturas em meio sólido:

- Deve-se retirar colônias suficiente para preencher uma alça bacteriológica calibrada de 10 µl, a partir de uma cultura em meio sólido que tenha sido incubada por, no máximo, 24 h
- Essa massa bacteriana deve ser transferida para microtubo, ressuspensa em 500 µl de tampão 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,8 (TE) e, em seguida, centrifugado por 4 min a 2500 x g e o sobrenadante deve ser descartado. Esse procedimento deve ser repetido por 3 vezes
- Após isso, o sedimento obtido deve ser ressuspensão em 100 µL desse mesmo tampão. Esta suspensão deve, então, ser mantida à temperatura de 100°C por 10 min e em seguida centrifugada por 30 s a 9000 x g, a 4°C

43. "Clonal Composition of *Staphylococcus aureus* Isolates at a Brazilian University Hospital: Identification of International Circulating Lineages" Adriana Marcos Vivoni et al. Journal of Clinical Microbiology, 44 (5)1689-1691(2006)

3 - TIPAGEM DE CEPAS DE *B. cereus* SENSO LATO ATRAVÉS DE REP-PCR

O DNA utilizado nas reações de Rep-PCR pode ser extraído segundo a metodologia de lise térmica descrita por Vivoni *et al.* e relatada acima ou, preferencialmente, através da metodologia de extração por fenol-clorofórmio. A metodologia de Rep-PCR para *Bacillus* descrita abaixo foi adaptada daquela descrita por Reyes-Ramires e Ibarra.⁴⁴

- As amplificações são em um volume de 25 μ L contendo: 300 ng de cada iniciador, 200 μ M de dNTP, 5mM de $MgCl_2$, 2,5U de *Taq*Polimerase e 1 μ L de DNA molde
- A análise dos perfis de bandejamento obtidos pode ser feita através de inspeção visual, no caso de as cepas a serem comparadas puderem ter o material amplificado colocado em um único gel ou, além disso, com o auxílio do programa Gel Compar no qual os dados obtidos podem ser utilizados como base na construção de dendrogramas

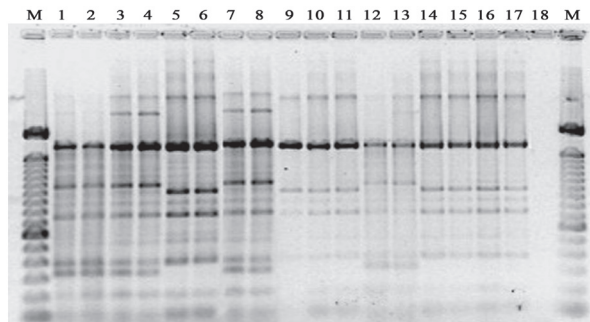


Figura 15: Tipos de Rep-PCR observados para estirpes de *B. cereus* isoladas de Ara ararauna. Linhas 1-3 - cepa 3, linhas 4-5 - cepa 4, linhas 6-7 - cepa 5, linhas 8-9 - cepa 6, linha 10 - cepa 7, linha 11 - cepa 8, linha 12 - cepa 9; linhas 13-14 - cepa 10, linhas 15-17 - cepa 11, linha 18 - em branco, M - 100 bp marcador de tamanho molecular.

44. Reyes-Ramirez, A. , Ibarra, J.E.. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence based PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology,71: 1346-1355 (2005).

4 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA, HEMOLISINAS (HLY II E HLY III), FOSFOLIPASES (PIPLC) E CEREOLISINAS A (PCPL) E B (SPH)⁴⁵

A presença dos genes codificadores dos fatores de virulência Hemolisinas (*hly II* e *hly III*), Fosfolipases (*piplc*) e Cereolisinas A (*pcpl*) e B (*sph*) em bactérias do grupo do *B. cereus* pode ser avaliada através de reações de PCR descritas por Hansen, 1998. Para tanto, utiliza-se o seguinte protocolo:

- 1 µL de DNA molde deve ser submetido à amplificação através de uma reação de volume final de 25 µl contendo 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 1x tampão PCR, 2 mM de MgCl₂, 1U de DNA *Taq* polimerase e 40 a 350 nM dos iniciadores
- A amplificação consiste de uma pré-amplificação por 5 min a 95°C, 30 ciclos de 94°C por 15 s, 56°C por 45 s, 72°C por 2 min para a desnaturação, anelamento e extensão do iniciador, respectivamente, e uma pós-amplificação por 7 min a 72°C. Os produtos da amplificação podem ser analisados pela separação de 10 µL do produto amplificado e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em Tris-borato EDTA (TBE 0,5x) (Tris-borato 89 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0) a 70 V por 45 min e visualizado sob a luz ultravioleta, após tratamento por 10 min com GelRed. Um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases de DNA deve ser usado como referência

Tipos de toxinas ^{45A}	Tamanho do produto
<i>hly II</i>	535 pb*
<i>hly III</i>	444 pb
<i>pcpl</i> (cer A)	536 pb
<i>sph</i> (cer B)	457 pb
<i>piplc</i> (fosfolipase)	569 pb

*Pares de bases

45. "Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potencial use in Biological Control", Edmar Justo de Oliveira et al., Applied and Environmental Microbiology, 70 (11)6657-6664 (2004)

45A. "Occurrence and pathogenic potencial of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam". N.B. Hendriksen et al., Antonie Van Leeuwenhoek, 89: 239-249 (2006)

- Preparação de DNAs gênicos e métodos baseados na reação da polimerase em cadeia- (PCR)⁴⁵
- Detecção de genes do DNA ribossomal 16S com hibridização por “Southern Blot”⁴⁶
- Extração de DNA por RAPD-PCR e na análise numérica⁴⁷
- Detecção dos genes das enterotoxinas⁴⁸
- Rep-PCR em *Bacillus*⁴⁹
- Identificação molecular de microrganismos queratinolíticos⁵⁰
- Perfis de protoxina de cristais de proteína (SDS-PAGE)⁵¹

ANEXO 35 - MÉTODOS FENOTÍPICOS APLICADOS À *Bacillus* E GÊNEROS CORRELATOS⁵²

- Preparação de Biomassa Bacteriana Ativa de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*
- Bioensaio de biomassas contra *Aedes aegypti*
- Eletroforese de Enzima Multilocus (MLEE)

-
- 45,46. “Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potencial use in Biological Control”, Edmar Justo de Oliveira et al., Applied and Environmental Microbiology, 70 (11) 6657-6664 (2004).
- 47,51. “Phenotypic and Genotypic Features of New Autoagglutinating *Bacillus thuringiensis* strains”. J. Q. Chaves et al., Journal of Invertebrate Pathology, 98: 85-92 (2008).
- 48,49. *Bacillus cereus* Infection Outbreak in Captive Psittacines”. S. N. Godoy et al., Veterinary Microbiology, 161:, 213-217 (2012)
50. “Biodegradation of Feather Waste by Extacellular Keratinases and Gelatinases from *Bacillus* spp”. A. M. Marzotto et al., World Journal Microbiololy Biotechnology, 27:1355-1365 (2011).
52. “Phenotypic and Genotypic Features of New Autoagglutinating *Bacillus thuringiensis* strains”. J. Q. Chaves et al., Journal of Invertebrate Pathology, 98: 85-92 (2008).

ANEXO 36 - TIPOS MORFOLÓGICOS DE ESPOROS, ESPORÂNGIOS E CADEIAS DE CÉLULAS

1- Esporos livres



2- Esporângios não deformantes



3- Esporângios deformantes



4- Posição Predominante do Esporo no Esporângio



5 - Tamanho de cadeias



Os tipos morfológicos serão definidos com observação ao microscópio de preparação em lâmina, a fresco, de suspensão de células crescidas durante 8–10 h; 16–18 h e 30 h a 33°C. Nessa lâmina à fresco com salina (NaCl 0,85%) e Ágar-ágar 0,5% estéril, observar 10 campos com contagens de 10 células por campo e verificar os tipos, em média, predominantes. Para exemplo, pode-se mencionar para esporos livres: “células predominantemente cilíndricas” ou “esporos predominantemente cilíndricos”.

ANEXO 37 - MEDIÇÃO DE CÉLULAS (Comprimento e Largura)

Com as suspensões de células obtidas no Anexo 36, preparar lâminas para microscopia e observar sob aumento de 2000 x, ou mais. Com a escala micrométrica colocada na ocular, proceder às medições como mostrado na Figura 16 a seguir, e expressar os resultados em μm . Para medir esporos livres, empregar as suspensões com 30 h de cultivo a 33° C.

Os desenhos a seguir ilustram a situação hipotética de células bacterianas dispostas sobre a escala do micrômetro ocular, de modo a se perceber como se determina o comprimento e a largura de uma bactéria. A parede da bactéria deve tangenciar pelo menos um traço do micrômetro ocular. O valor de cada traço já foi calculado anteriormente para o microscópio Carl Zeiss com objetiva Apochromat de 100 x e ocular PK 12,5 x em que a medida obtida entre 2 traços do micrômetro ocular equivale a $0,6 \mu\text{m}$. Assim, se a extensão corresponder a 7 traços e à 4 traços (Figura A), os comprimentos serão de $4,2 \mu\text{m}$ e de $2,4 \mu\text{m}$, respectivamente. No tocante à largura, a figura B corresponderá aproximadamente a $0,8 \mu\text{m}$ e de $1,2 \mu\text{m}$, respectivamente. Quando a célula não corresponder no micrômetro ocular exatamente à distância entre traços, o cálculo deverá corresponder a uma estimativa.

Como lembrete, a ampliação final de um objeto será o resultado da multiplicação do número de aumentos existentes na objetiva pelo valor da angulação do microscópio pelo aumento da ocular. Exemplo: $100 \times 1,6 \times 12,5 = 2000 \times$.

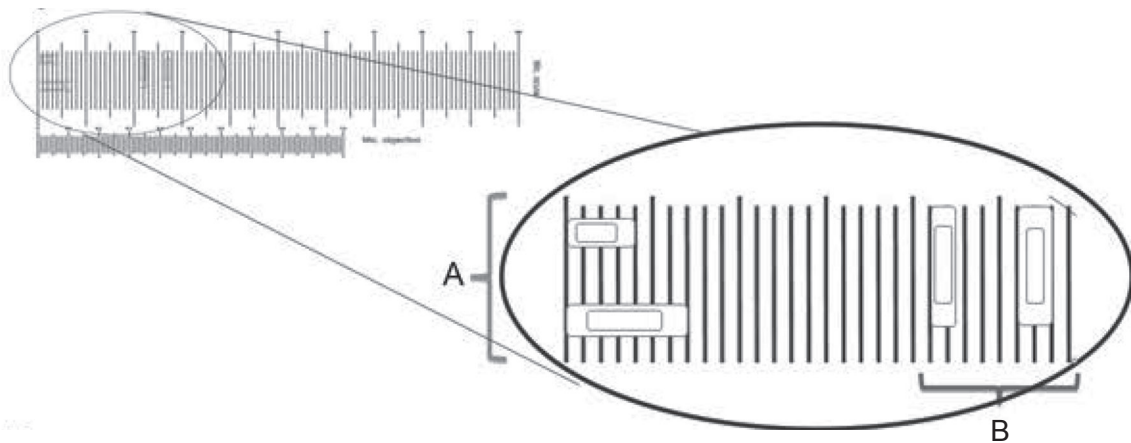


Figura 16: Escala micrométrica

Observação:

- Conceitos de Comprimento e Largura: 1- Bastão curto $\leq 5 \mu\text{m}$; 2- Bastão longo $> 5 \mu\text{m}$; 3- Estreito $\leq 1 \mu\text{m}$ e 4- Largo $> 1 \mu\text{m}$

ANEXO 38 - PROTOCOLOS DE ENSAIOS ANTIMICROBIANOS CONTRA BACTÉRIAS DE INTERESSE DAS ÁREAS DE SAÚDE E AMBIENTE

A interação entre o homem-animais-meio ambiente e microrganismos nem sempre é benéfica. Nesse sentido inúmeras pesquisas têm se voltado para a descoberta e elaboração de novas drogas antimicrobianas, visando à prevenção, controle e erradicação de agentes bacterianos infecciosos perniciosos a seres humanos e animais, particularmente aqueles multirresistentes. O mesmo é válido para o controle de bactérias ambientais envolvidas com prejuízo de materiais e estruturas físicas como, por exemplo, os consórcios bacterianos ligados à biocorrosão, particularmente presentes no ataque de tubulações metálicas da indústria petrolífera.

Protocolo analítico

A avaliação da presença ou ausência de atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal (extratos e suas frações, fitomoléculas e análogos estruturais sintetizados) será realizada inicialmente através do método de difusão em gel com emprego de disco de papel (evidenciação de halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor do disco) e, posteriormente, caso evidenciada a atividade, prosseguirá com auxílio dos métodos de macro e, ou, microdiluição. Nesse caso, o objetivo será determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB).

Preparação da solução estoque de produtos vegetais⁵³

- ⇒ Dissolver 20 mM ou 20 mg/mL de produtos vegetais em um dos seguintes solventes: água, metanol (MeOH) a 80%, etanol (EtOH) a 80% ou dimetil sulfóxido (DMSO) a 100%
- ⇒ Esta solução estoque deverá ser mantida a -20°C e ao abrigo da luz, em frasco de cor âmbar

Preparação dos discos com produtos vegetais para os ensaios de triagem^{54,55}

- ⇒ Impregnar discos de papel de filtro (Sensidisk, Cecon) com 10 µL da solução estoque de produtos vegetais
- ⇒ Secar a 33°C
- ⇒ Manter a -20°C e ao abrigo da luz, para serem utilizados em teste de difusão em meio sólido

53. “Anti-infective Potential of Natural Products: How to Develop a Stronger in Vitro proof-of-concept”. COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. *Journal of Ethnopharmacology* 106:290-302, 2006.

54. “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement”. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S22, v. 32, 3, 2012.

55. “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)”; Approved Standard – Ninth Edition. M07-A9, v. 32, 2, 2012.

Preparação das diluições de produtos vegetais e de controles para os ensaios

- ➔ Preparar as diluições, usando tubos de ensaio estéreis (13 x 100 mm) ou placas de poliestireno estéreis (96 poços de fundo redondo, com tampa)
- ➔ Usar sempre um controle contendo Caldo MH, um controle contendo Caldo MH adicionado dos produtos vegetais testados e um controle contendo Caldo MH com adição das cepas microbianas testadas nos ensaios de atividade potencial
- ➔ Preparar diluições em Caldo MH que abranjam as concentrações finais na faixa de 512 µg/mL a 0.25µg/mL

Cepas bacterianas padrão a serem testadas, de interesse ambiental

- *Bacillus amyloliquefasciens* (ATCC 23892)
- *Bacillus cereus* (NTCC 2599)
- *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580)
- *Bacillus licheniformis* (Coleção do CENPES T.3-1)
- *Bacillus licheniformis* (Coleção do CENPES T.3-2)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- *Paenibacillus macerans* (ATCC 8244)

Tabela 10: cepas de interesse nas áreas de saúde humana e animal

Cepas	Características
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	resistente a aminoglicosídeos
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	resistente à vancomicina
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	produtora de beta-lactamase
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)
<i>Salmonella Enteritidis</i> (ATCC 13076)	-
<i>Salmonella Typhi</i> (ATCC 19214)	resistente à tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e sulfanilamida
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 14028)	-
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	produtora de beta-lactamase

Observação:

- Inicialmente os produtos serão testados frente às cepas de *Bacillus amyloliquefasciens* (ATCC 23892), *Bacillus cereus* (NTCC 2599), *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580), *Bacillus licheniformis* (Coleção do CENPES T.3-1), *Bacillus licheniformis* (Coleção do CENPES T.3-2), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Paenibacillus macerans* (ATCC 8244), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). Detectando-se atividade antimicrobiana, os testes poderão ser estendidos para outras diluições e demais cepas bacterianas.

Armazenamento de cepas de controle de qualidade

No caso de armazenamento prolongado, essas culturas de referência deverão ser mantidas em temperatura de -20°C , liofilizadas ou em meio estabilizador adequado, como Caldo de Soja Triptica com 10-15% de glicerol (adicionado de antimicrobianos, quando recomendado).

As culturas liofilizadas ou congeladas devem ser subcultivadas por duas vezes antes da realização dos testes de sensibilidade.

As culturas das cepas controle em uso podem ser mantidas em Ágar de Soja Triptica ou Ágar Nutriente (adicionados de antimicrobianos, quando recomendado), em refrigeração de $2-8^{\circ}\text{C}$, fazendo-se uma subcultura semanal durante, no máximo, três semanas consecutivas. Antes do teste, deve-se fazer subculturas das cepas em ágar, a fim de se obter colônias isoladas.

Preparação do inóculo bacteriano

Preparar o inóculo padrão para testes de difusão em disco, de macrodiluição (em tubos) ou de microdiluição (em microplacas) em Caldo MH, após o cultivo dos microrganismos crescidos em placa, se dará pela transferência de 3 a 5 colônias para um tubo que tenha 4-6 mL de meio adequado (exemplo, TSB) até a fase exponencial, em geral, de 3-5 h de incubação à 35°C , visando atingir a turbidez compatível com uma solução padrão do tubo 0.5 da Escala de Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). O inóculo, através de espectrofotômetro (leitura de 0.08 a 0.10 em absorbância sob 625 nm), deverá ser ajustado com Caldo MH ou solução salina estéril (NaCl 0,85%). O mesmo, após as diluições descritas abaixo deverá ser adicionado às placas de Ágar MH, aos tubos ou microplacas em intervalo de tempo inferior a 15 min.

A detecção da atividade antimicrobiana será efetuada pelo método de difusão em gel com emprego de disco de papel que, conseqüentemente, determinará a aplicação das técnicas de macro ou microdiluição.

No teste da macrodiluição, o inóculo ajustado (1×10^8 UFC/mL) deverá ser diluído 1:100 em Caldo MH ou solução salina estéril (1×10^6 UFC/mL) e, em seguida, transferindo 1 mL deste para cada tubo contendo 1mL dos produtos vegetais (concentração bacteriana final: 5×10^5 UFC/mL), que abrangerão as diferentes concentrações a serem testadas .

No teste da microdiluição em placas, o inóculo ajustado (1×10^8 UFC/mL) deverá ser diluído 1:10 (1×10^7 UFC/mL), sendo que 5 μL serão dispensados em 100 μL dos produtos vegetais (concentração bacteriana final: 5×10^5 UFC/mL) nas diferentes concentrações a serem testadas.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) será calculada considerando-se a menor concentração dos produtos vegetais capaz de inibir o crescimento bacteriano (ausência de turvação).

As Concentrações Inibitórias de 50% (CI_{50}) e de 90% (CI_{90}) das UFC serão calculadas pela verificação da redução de UFC entre a cultura controle e a cultura do último tubo ou poço com ausência de turvação e do tubo ou poço, imediatamente ao anterior, com turvação. Partindo-se do princípio que há 5×10^5 UFC/mL na cultura controle, tanto no tubo quanto no poço, ao se fazer uma diluição de 1:1000 (acrescentando 0,01 mL a 10 mL), vai-se ter 5×10^2 UFC/mL (ou aproximadamente 500 UFC/mL). Se, a seguir, inocular-se 0,1 mL desta suspensão em Ágar Sangue, será observado o aparecimento de cerca de 50 UFC.

Quanto à Concentração Mínima Bactericida (CMB), esta será verificada pela transferência de uma alíquota de 10 μ L do primeiro poço ou tubo que não apresentar turvação para uma placa de Ágar Sangue.

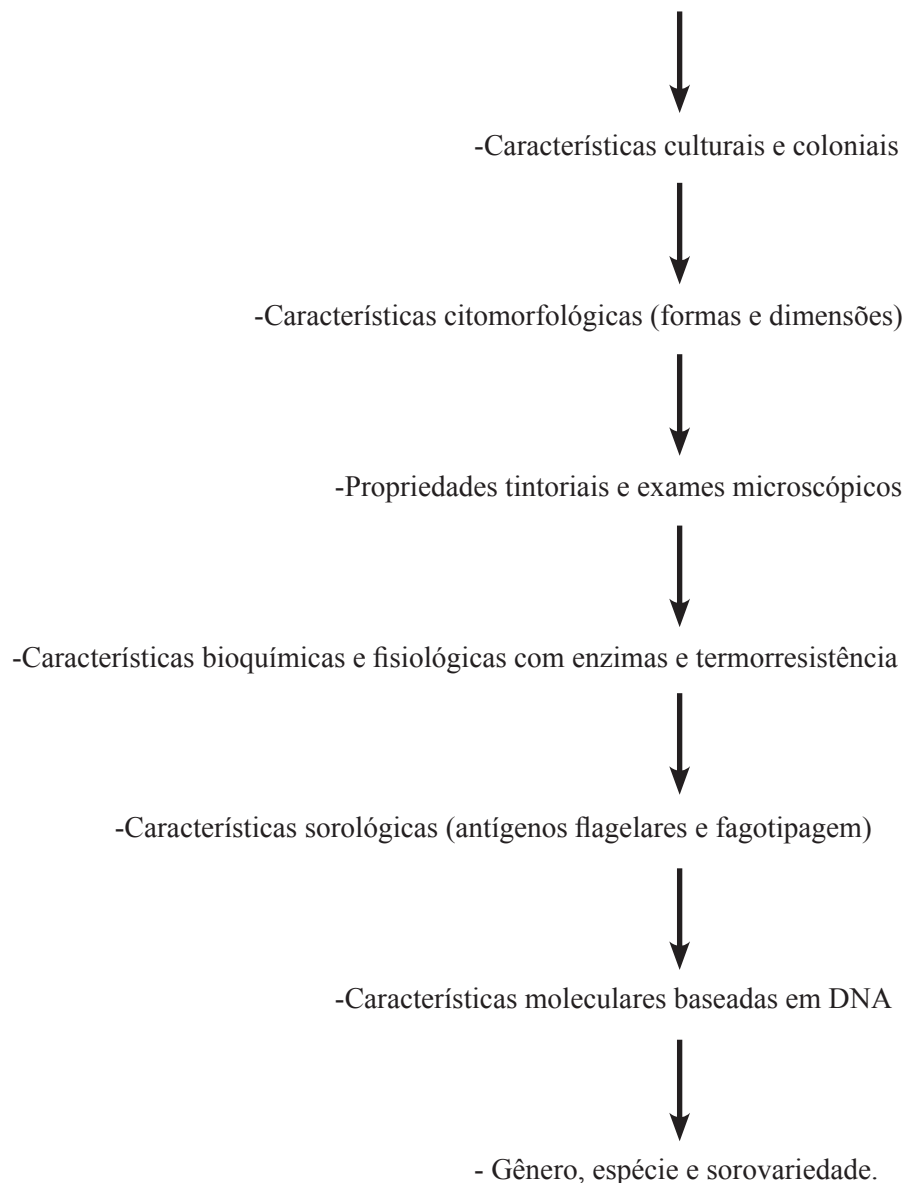
Visando melhor quantificar visualmente o crescimento bacteriano, pode-se incluir a resazurina ou o cloridrato de trifeniltetrazólio (TTC), na concentração final de 0.01 %, (w/v) no Caldo MH.^{56,57}

56. "Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria". ELOFF, J.N.A. *Planta Médica* 64, 711-713, 1998.

57. "Evaluation of Redox Indicators and The Use of Digital Scanners and Spectrophotometer for Quantification of Microbial Growth in Microplates". GABRIELSON, J. ; HART, M. ; JARELÖV, A. ; KÜHN, I. ; MCKENZIE, D. ; MÖLLBY, R.J. *Microbiol. Methods* 50, 63-73, 2002.

ANEXO 39 - SÚMULA DE ROTA PARA IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO CELULAR E DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE BASTÃO ESPORULADO, GRAM-POSITIVO, AERÓBIO OU AERÓBIO FACULTATIVO*

Fonte de material com microrganismos**- Linhagem bacteriana pura (ou *axênica*)



(*) Baseado em Logan et al., 2009, com o título: “Proposed Minimal Standards for Describing New Taxa of Aerobic, Endospore-Forming Bactéria”. Nem sempre a rota apresentada necessita ser completa para a especiação.

(**) Fonte contendo um ou mais microrganismos esporulados.

Excerto de Oswaldo Gonçalves Cruz:

“À vista d’estes caracteres morphicos e biológicos pareceu-nos que estávamos em face do *bacillus fluorescens liquefasciens* descripto por Flugge, e esta suposição tornou-se em realidade quando comparámos bacillo por nós isolado com uma cultura pura do *fluorescens liquefasciens*, trazida da Alemanha e a nós oferecida pelo nosso excelente amigo o Sr. Dr. F. Fajardo. Isolamos, pois, da agua do Instituto de Hygiene da Faculdade o *bacillus fluorescens liquefasciens*.”

Trecho de texto original de Oswaldo Gonçalves Cruz, então estudante de medicina, auxiliar do Instituto de Hygiene, *in*: Oswaldo Gonçalves Cruz – Opera Omnia, de Emilia Bustamante (editoria), *Microbiologia*, pág. 4, Agosto de 1972, Impressora Brasileira Ltda., Rio de Janeiro.