Implementação de metodologia para a taxonomia de bactérias do processo bioetanol e de patógenos marinhos

Ana Paula Barbosa Moreira

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para Obtenção do Grau de Mestre em Ciências (*MSc*)

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD* e Fabiano Lopes Thompson*, PhD*

Escola de Química

Universidade Federal do Rio de Janeiro

2010

Implementação de metodologia para a taxonomia de bactérias do processo bioetanol e de patógenos marinhos

Ana Paula Barbosa Moreira

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para Obtenção do Grau de Mestre em Ciências (*MSc*)

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2010

Ficha Catalográfica

Moreira, Ana Paula Barbosa

Implementação de metodologia para a taxonomia de bactérias do processo bioetanol e de patógenos marinhos/Ana Paula Barbosa Moreira – Rio de Janeiro, 2010.

xv, 88 f, 29,7 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2009.

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD* e Fabiano Lopes Thompson, *PhD*

1. Taxonomia de procariontes
2. Bactérias do processo bioetanol
3. Vibrios de corais
4. Real Time PCR
5. ΔTm
6. Conteúdo de GC

I. Pereira Jr., Nei; Thompson, Fabiano L. (Orientadores)
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. Pós-graduação em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos.
III. Título.

Implementação de metodologia para a taxonomia de bactérias do processo bioetanol e de patógenos marinhos

Ana Paula Barbosa Moreira

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisistos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

Aprovada por:

Nei Pereira Jr., *PhD*
Escola de Química / UFRJ
Orientador (Presidente da Banca)

Fabiano Lopes Thompson, *PhD*
Depto de Genética – IB / UFRJ
Orientador

Eliana Camporese Sérvulo, *DSc*
Escola de Química / UFRJ

Marcos Antônio de Morais Jr. , *DSc*
Depto de Genética / UFPE

Ana Carolina Paulo Vicente, *DSc*
FIOCRUZ

"É graça divina começar bem.

Graça maior persistir na caminhada certa.

Mas graça das graças é não desistir nunca."

Dom Hélder Câmara

Agradecimentos

A Deus, por ter me trazido até aqui, materializando todas as contribuições que precisei, como se pode ver a seguir.

Ao meu orientador Nei Pereira Jr., pelo entusiasmo com que acolheu o projeto e a mim, na condição de estudante, pelo incentivo sempre, e por ter compartilhado seu tempo e sua sabedoria me oferecendo a oportunidade de crescer profissionalmente.

Ao meu orientador Fabiano Lopes Thompson, por ter me acolhido em seu grupo e também por ter compartilhado seu tempo, seu conhecimento e suas idéias, não poupando esforços para que fosse possível a realização do trabalho e meu desenvolvimento profissional.

À coordenadora do programa Profa. Ofélia de Queiroz F. Araújo, pelo apoio durante o curso, atendendo todas as minhas necessidades, relativas à participação em congressos, esclarecimentos e solução de questões relativas aos trâmites acadêmicos.

Ao Prof. Marcos Morais, pela colaboração, imprescindível para a realização do trabalho. À sua aluna e doutoranda, Brígida, por ter fornecido as amostras e disponibilizado informações.

À Cristiane Thompson, por haver gentilmente cedido diversas amostras de DNA e pelo apoio.

À equipe do Lab. de Microbiologia, pelo coleguismo. Ciência é uma atividade eminentemente de grupo. Agradecimentos igualmente importantes aos funcionários.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio, especialmente minha mãe Elisa e meu sobrinho Gabriel. Ao meu primo Luís, professor de matemática, agradeço também o incentivo e suporte técnico.

IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A TAXONOMIA DE BACTÉRIAS DO PROCESSO BIOETANOL E PATÓGENOS MARINHOS

Resumo da Dissertação de MSc apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil.

Ana Paula Barbosa Moreira

Orientadores: Nei Pereira Jr. e Fabiano Lopes Thompson

A importância do bioetanol combustível decorre das vantagens econômicas da sua produção e dos benefícios ambientais do seu consumo. O rendimento da fermentação alcoólica no processo bioetanol é dramaticamente afetado por cofermentações conduzidas por bactérias resistentes aos métodos de controle. O conhecimento sobre a microbiologia do processo é limitada devido aos métodos de identificação empregados, geralmente fenotípicos. Neste trabalho foi aplicada a taxonomia polifásica na identificação de isolados do processo bioetanol provenientes de três usinas nordestinas e previamente reunidos, segundo a técnica ARDRA, em grupos de espécies de lactobacilos. O sequenciamento parcial do gene *phe*S e total do RNAr 16S permitiu claramente a identificação dos 4 grupos de isolados, tendo discriminado outros gêneros BAL além de *Lactobacillus*. Permitiu ainda a identificação, em nível de espécie, de *Weissella paramesentoides* e indicou a presença de uma nova espécie de *Oenococcus*. Para a descrição da nova espécie e identificação sistemática de isolados do bioetanol, foi implementada nova metodologia de identificação de procariontes que se baseia na determinação fluorimétrica da ΔTm entre espécies relacionadas em plataforma de rtPCR. Nas etapas de implementação da metodologia, incluindo a etapa pré-requisito de determinação da %GC fluorimetricamente, também com uso de rtPCR, foi utilizado o sistema vibrios patógenos de corais como modelo de estudo. Desse modo os resultados obtidos puderam ser comparados aos resultados pretéritos segundo o método clássico para validação da metodologia.

IMPLEMENTATION OF METHODOLGY FOR BIOETHANOL PROCESS BACTERIA AND MARINE PATHOGENS TAXONOMY

Abstract of the M.Sc. Dissertation presented to the graduate program on Technology of Chemical and Biochemical Processes of the Chemical High School of Federal University of Rio de Janeiro – Brazil.

Ana Paula Barbosa Moreira

Supervisors: Nei Pereira Jr. and Fabiano Lopes Thompson

The economical advantages of fuel ethanol production and the environmental benefits of its consumption are the main reasons for this biofuel growing importance. Ethanol yield on alcoholic fermentation process is dramatically affected by co-fermentations conducted by bacteria resistant to contaminant control methods. The knowledge about fuel alcohol process microbiology is limited due to the phenotype based identification methods, generally employed. In this study, the polyphasic taxonomy approach was adopted to identify isolates from three northeastern industrial plants. The isolates were previously grouped according to ARDRA in four lactobacilli groups. The parcial sequencing of the *phe*S gene and the total sequencing of the 16S rRNA clearly allowed the discrimination of other LAB genus than *Lactobacillus*. It was possible to identify the species *Weissella paramesenteroides* and delineate a novel *Oenococcus* species. To describe this new species and sistematically identify ethanol bioprocess isolates a new prokaryote identification methodology was implemented which is based on the fluorimetric ΔTm measurement with a rtPCR platform. During the implementation steps, including the prerequisite fluorimetric GC% determination, also with rtPCR, the model system used was coral pathogen vibrios. Therefore the results obtained were compared to previous data generated with the standard method aiming the new methodology validation.

Índice Geral

Capítulo 1

1 Apresentação do tema da dissertação 1

Capítulo 2

2 Taxonomia microbiana: rumo a uma alternativa à hibridização de DNA clássica 5
2.1 Taxonomia microbiana e processos fermentativos 6
2.2 Avanços na identificação de procariontes: da morfologia ao MLSA 7
2.3 Estratégias para medir similaridade entre genomas 9
2.3.1 Hibridização DNA-DNA (HDD) 11
2.3.2 Desnaturação térmica do DNA e ΔTm 12
2.4 Medida do conteúdo de GC em plataforma de PCR em tempo real 16

Capítulo 3

3 Diversidade microbiana 18
3.1 Bactérias láticas contaminantes do processo bioetanol 18
3.1.1 A fermentação alcoólica no processo bioetanol 18
3.1.2 Microbiologia da fermentação no processo bioetanol 20
3.1.3 Taxonomia de lactobacilos 23
3.2 Vibrios patógenos de corais 26

Capítulo 4

4 Objetivos 28
4.1 Objetivo Geral 28
4.2 Objetivos específicos 28

Capítulo 5

5 Materiais e Métodos 29
5.1 Etapa 1 31
5.1.1 Isolados do processo fermentativo da cadeia bioetanol 31
5.1.2 Cultivo e preservação dos isolados 32
5.1.3 Extração de DNA 32
5.1.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) 32
5.1.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose 34
5.1.6 Purificação dos Produtos de PCR 34
5.1.7 Quantificação do DNA purificado 35
5.1.8 Sequenciamento de DNA 35
5.1.9 Reconstrução filogenética 37
5.1.10 Caracterização fenotípica 38
5.2 Etapa 2 40
5.2.1 Cultivo e preservação das amostras tipo de vibrios patógenos de corais 40
5.2.2 Extração do DNA genômico 40
5.2.3 Avaliação da qualidade e quantificação do DNA genômico 42
5.2.4 ΔTm em plataforma de rt PCR 42
5.2.5 %GC em plataforma de rt PCR 45

Capítulo 6

6 Resultados e Discussão 50
6.2 Etapa 1: Taxonomia polifásica.....50
6.3 ETAPA 2: Estabelecimento de nova metodologia para identificação de procariontes com base na determinação de ΔTm usando rtPCR 59
6.2.1 ΔTm em plataforma de rt PCR 60
6.2.2 %GC em plataforma de rt PCR 67
6.2.3 Considerações gerais.....70

Capítulo 7

7 Conclusões, sugestõe perspectivas 72
7.1 Conclusões 72
7.2 Sugestões 73
7.3 Perspectivas.....73

Capítulo 8

8 Referências bibliográficas 76

Índice de Figuras

Figura 2.1: Correlação direta entre os valores de similaridade baseados em 200 características fenotípicas (%S) e os valores de reassociação de ácidos nucléicos (%R) para linhagens de vibrios. **ESQUERDA**: *V. cholerae*; **DIREITA**: *V. parahaemolyticus*. (Adaptado de Colwell, 1970).....**8**

Figura 2.2: Estratégias experimentais de reassociação DNA-DNA (adaptado de Roselló-Mora & Amann 2001).....**10**

Figura 2.3: Correlação entre os valores de RHR e ΔTm referentes a 111 pares de linhagens, de diferentes grupos taxonômicos, disponibilizados no volume 49 do periódico especializado IJSB, de 1999. As áreas hachureadas indicam os intervalos nos quais é mais provável a observação de medidas discrepantes. A área hachureada em azul refere-se às medidas de RHR e a área hachureada em verde refere-se às medidas de ΔTm (Adaptado de Roselló-Mora & Amann 2001). ...**13**

Figura 2.4: Desnaturação térmica do DNA genômico de *Pyrococcus horikoshii* (curva em preto) e do DNA híbrido de *P. horikoshii e P. endeavori* (curva em cinza) na presença de SYBR , em plataforma de rtPCR (iCYCLER, BIORAD). O intervalo demarcado pela seta dupla é a ΔTm entre os pares de linhagens (Adaptado de Gonzalez & Saiz-Jimenez, 2005).....**15**

Figura 3.1: Fluxograma da produção de açúcar e álcool com destaque para o processo fermentativo,emoldurado em vermelho (adaptado de Brugnaro & Sbragia, 1986) **19**

Figura 3.2: Famílias da ordem *Lactobacillales*, incluindo *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. Árvore baseada em seqüências do **RNAr 16S** de aproximadamente 1400 nts tendo sido os dados e as ferramentas de análise subsidiados por SILVA *comprehensive ribosomal RNA databases* (Adaptada de Ludwig, Schleifer & Whitman, 2009). **23**

Figura 3.3: Árvore neighbour joining construída com seqüências totais do **rRNA 16S** de 201 linhagens tipo de *Lactobacillus*, sendo 98 espécies e 17 subespécies. À esquerda estão indicados os grupos de espécies e entre parênteses, à direita, o número de acesso da seqüência gênica (EMBL) (adaptado de Naser et al., 2007).....**26**

Figura 5.1: Fluxograma indicando os conjuntos de atividades aplicadas nas 2 etapas do trabalho. **ETAPA 1**: taxonomia polifásica; e **ETAPA 2**: implementação da nova metodologia de identificação de procariontes com base no uso de plataforma de rtPCR para determinação da ΔTm e da %GC. **30**

Figura 5.2: Fontes de carbono e mapa da GP2 MicroPlate (Biolog) **39**

Figura 5.3: Plataforma de rtPCR modelo ABI 7500. À esquerda está representado o modo de interface com o equipamento através do 7500 Software v.2.0.1(Applied Biosystems).....**43**

Figura 5.4: Método da corrida visualizado na interface do equipamento: 7500 *Software* v.2.0.1 (Applied Biosystems).....**44**

Figura 5.5: **ACIMA**: Curva característica da **absorbância** a 260 nm (A_{260}) durante a desnaturação témica de solução de DNA em tampão citrato: a Tm é o ponto médio da desnaturação, graficamente é o ponto de inflexão entre as assíntotas inferior e superior. **ABAIXO**: Curva característica da **fluorescência** (%) durante a desnaturação témica de solução de DNA, em presença de SYBR GREEN I, em tampão citrato: a Tm é o ponto médio da desnaturação, graficamente é o ponto de inflexão entre as assíntotas inferior e superior (adaptado de Zaha, Ferreira & Passaglia, 2003).....**47**

Figura 6.1: Árvore *Neighbor-Joining* representativa dos gêneros *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Weissella,* baseada em sequências parciais do gene ***pheS*** de linhagens tipo e de isolados do processo fermentativo bioetanol. A significância está representada pelo valor de *bootstrap* (%) calculado com base em 1000 réplicas. Apenas valores acima de 50% estão representados. A barra de escala representa 5% de diferença. A nomenclatura dos isolados foi estabelecida de acordo com a

identificação prévia realizada com a técnica ARDRA. **TRIÂNGULO**: *Lactobacillus* sp. 25; **TRIÂNGULO INVERTIDO**: *Lactobacillus* sp. 20; **CÍRCULO**: BL7,e LOSANGO: *Lactobacillus* sp. 21. *Carnobacterium maltaromaticum* foi incluída como *outgroup*.....**51**

Figura 6.2: Árvore *Neighbor-Joining* representativa dos gêneros *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella* e *Lactobacillus*, baseada em sequências parciais do **rRNA 16S** de linhagens tipo e de isolados do processo bioetanol. A significância está representada pelo valor de *bootstrap* (%) calculado com base em 1000 réplicas. Apenas valores acima de 50% estão representados. A barra de escala representa 2% de diferença. A nomenclatura dos isolados foi estabelecida de acordo com a identificação prévia realizada com a técnica ARDRA. **CÍRCULO**: BL7 e **LOSANGO**: *Lactobacillus* sp 21. *Enteroccocus faecalis* foi incluído como *outgroup*.....**55**

Figura 6.3: **ACIMA**: Correlação entre os resultados de ΔTm obtidos e os valores pretéritos de HDD, segundo a metodologia convencional, para 19 pares de **vibrios**. **ABAIXO** (adaptado de Gonzalez & Saint Jimenez, 2005): Correlação obtida por Gonzalez & Saint Jimenez (2005) entre os resultados de ΔTm obtidos para **hipertermofílicos** e os valores pretéritos de HDD, segundo a metodologia convencional. A seta indica pontos que não são referentes a pares de espécies, mas sim DNAs homólogos. Abaixo da linha cheia paralela à abscissa estão os pontos referentes a pares com valores de HDD < 20% (não incluídos na Tabela 6.3). **63**

Figura 6.4: Valores de HDD (%) na ordenada à esquerda, e de ΔTm (^{o}C) na ordenada à direita, para 4 pares de linhagens intimamente relacionadas.....**65**

Figura 6.5: Aos três grupos distintos quanto à faixa de HDD, correspondem três grupos distintos quanto à média dos valores de ΔTm, determinada pelo método fluorimétrico estabelecido. Para o grupo de linhagens com valores de HDD entre 20 e 59%, a média dos valores obtidos de ΔTm é 8,43. Para o grupo de linhagens com valores de HDD entre 60 e 80%, a média dos valores obtidos de ΔTm é 6,04. Para o grupo de linhagens com valores de HDD entre 81 e 100%, a média dos valores obtidos de ΔTm é 3,72.....**66**

Figura 6.6: **ESQUERDA**: curvas de desnaturação dos DNAs das linhagens *V. hispanicus* LMG 13240^{T} (42,8 %GC), *V. kanaloae* INCO 191^{T} (44, 7 %GC) e *V. furnissii* LMG 7910^{T} (50,4 %GC). **DIREITA**: 1ª derivada negativa das curvas de desnaturação, cujo valor máximo corresponde às Tms das linhagens, respectivamente, 77,44, 78,96 e 82,29 ^{o}C.....**68**

Figura 6.7: Correlação entre Tm determinada fluorimetricamente com uso de plataforma de rtPCR e %GC de acordo com dados da literatura. À direita curva gerada com os resultados obtidos e à esquerda curva determinada pelos pontos experimentais obtidos pelos autores da metodologia (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ, 2002) para 6 espécies com %GC na mesma faixa dos vibrios avaliados. **69**

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Números absolutos e porcentagens de artigos ou novas descrições publicados nos seis números do volume 54 do IJSEM, durante 2004 (Adaptado de ROSELLÓ-MORA, 2006).....**11**

Tabela 3.1: Distribuição dos produtos da fermentação alcoólica por S. cerevisiae, em g/100g de glicose e rendimento real, estimado segundo diferentes autores (adaptada de BORZANI, 2001):.....**20**

Tabela 3.2: Patógenos de corais (adaptada de Rosenberg et al., 2007).....**26**

Tabela 5.1: Isolados do processo bioetanol, de três usinas do Nordeste, reunidos em 4 grupos segundo a técnica ARDRA, e estudados na 1ª etapa do trabalho: **31**

Tabela 5.2: Iniciadores utilizados na PCR e sequenciamento: **35**

Tabela 5.3: Linhagens de vibrios patógenos de corais utilizadas nos ensaios de ΔTm e % GC **49**

Tabela 6.1: Comparação das propriedades metabólicas dos isolados BL7 - M7.2.18 e JP7.3.6 - com relação às duas outras espécies do gênero, *O. oeni* e *kitaharae*.....**57**

Tabela 6.2: Comparação dos isolados M7.2.18 e JP7.3.6 com relação às duas outras espécies do gênero, *O. oeni* e *kitaharae*, quanto ao requerimento de fator suco de tomate para o crescimento e tolerância ao oxigênio: **58**

Tabela 6.3: Comparação entre os valores de ΔTm (^{o}C) obtidos para 19 pares de vibrios patógenos de corais com os respectivos valores pretéritos de HDD (%); e valores de ΔTm (^{o}C) de Gonzalez & Saint Jimenez (2005), e Jurado e colaboradores (2008), também com os respectivos valores pretéritos de HDD (%): **61**

Lista de Siglas e Abreviaturas

ΔTm: Delta Tm

%GC: Conteúdo de guanina e citosina do genoma

%R: Porcentagem de reassociação

%S: Porcentagem de similaridade

A: Absorbância

A_{230}: Absorbância a 230 nm

A_{260}**:** Absorbância a 260 nm

A_{280}**:** Absorbância a 280 nm

A_{max}: Absorbância máxima

ARDRA:Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado

BAL: Bactérias do Ácido Lático

BG 1: Levedura isolada da Usina Barra Grande

CR1: Levedura isolada da Usina Cresciumal

ATCC: *American Type Culture Collection*

BCCM/LMG: *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms*

BNDES: Banco Nacional do Desenvolvimento

CAIM: *Collection of aquacultural important microorganisms*

CAT -1: Levedura isolada da Usina Catanduva

CBS: *Centraalbureau vor Schimmecultures*

CCBD: Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas

CCT: Coleção de Culturas Tropical

CGEE: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CL: Levedura isolada da Usina Clealco

DNAfd: DNA fita dupla

DNAfs: DNA fita simples

DSMZ: *German National Resource Centre for Biological Material*

E10: Mistura de 10% de combustíveis renováveis aos fósseis

EDTA: *Ethylene-diamine-tetra-acetic acid*

EMBL: *European Molecular Biology Laboratory*

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

F: Iniciador *forward* (direto)

FAT: Fundação André Tosello

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz.

GES: *Guanidiumthiocyanate-EDTA-N-lauryl-sarcosine*

HDD: Hibridização DNA-DNA

HPLC: *High Pressure Liquid Cromatography*

INCO: *Vandenberghe INCO culture collection*

IJSB: *International Journal of Systematic Bacteriology*

IJSEM: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

JCM: *Japan Collection of Microorganisms*

LPSN: *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MLSA: *Multilocus Sequence Analysis*

mol% G+C: Conteúdo de guanina e citosina do genoma

MME: Ministério de Minas e Energia

MRS: Meio de cultivo comercial *Man*, *Rogosa and Sharpe*

NCBI: *National Center for Biotechnology* Information

nt(s): Nucleotídeo(s)

OD: Densidade ótica

ON: *Overnight* (duante a noite)

PCR: *Polymerase chain reaction* (reação da polimease em cadeia)

PE-2: Levedura isolada da Usina da Pedra

PUBMED: Banco público de dados da *U.S. National Library of Medicine*

R: Iniciador *reverse* (reverso)

RHR: Razão de hibridização relativa

qrtPCR: PCR quantitativa em tempo real

rtPCR: PCR em tempo real

SA-1: Levedura isolada da Usina Santa Adélia

SILVA*: Comprehensive ribosomal RNA databases*

SSC: *Standard Saline Citrate*

SYBR: SYBR GREEN I

TE: Tampão Tris-EDTA

Tm: Temperatura média ou ponto médio da desnaturação térmica do DNA

T_{OR}: Temperatura ótima de renaturação

TSB: Meio de cultivo comercial *Tryptic Soy Broth*

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UNICA: União da Indústria de Cana-de-Açúcar

USDA: *United States Department of Agriculture Culture Collections*

UV: Ultravioleta

WDCM: *World Data Center for Microorganisms*

Capítulo 1

Apresentação do tema da dissertação

A produção brasileira de bioetanol superou a marca de 27 bilhões de litros na safra 2008/2009, dos quais foram exportados mais de 5 bilhões de litros em 2008, resultando na arrecadação de cerca de 2,4 bilhões de dólares (MAPA, 2009). Neste mesmo ano, o etanol combustível representou aproximadamente 16,5 bilhões de dólares do faturamento do setor sucroenergético (NEVES, TROMBIN & CONSOLI, 2009). Segundo o ministro de Minas e Energia, Edison Lobão, o objetivo é produzir 64 bilhões de litros em 2017, destinando 8 bilhões ao mercado externo, e assim consolidar a liderança mundial em relação à produção e exportação (MME, 2009). No âmbito mundial, projeta-se para 2010 uma demanda de 101 bilhões de litros, frente a uma oferta estimada em 88 bilhões de litros (BNDES & CGEE, 2008). Na União Européia, foi aprovada a Diretiva sobre Fontes Renováveis, que estabelece a mistura de 10% de combustíveis renováveis aos fósseis (E10) até 2020 no setor de transportes (ZECHIN, 2009). Países escandinavos lideram o movimento Futuro com Emissões Zero de CO_2 e em 2008 a Suécia já era o maior importador de etanol combustível de cana-de-açúcar produzido no Brasil (UNICA, 2008). Diante do desafio de atender às metas de produção, garantindo o suprimento do crescente mercado interno e aproveitando a oportunidade que se apresenta com a aceleração da demanda internacional, são requeridos esforços contundentes com foco na minimização dos efeitos dos gargalos da cadeia produtiva.

No Brasil, a matéria-prima determina 60% do custo final do etanol carburante. Uma parcela significativa do solo presente nas raízes da cana entra no processo carreando microrganismos. Características da cana-de-açúcar, tais como elevadas

atividade de água e porcentagem de açúcar e a presença de aminoácidos contribuem para facilitar a deterioração em decorrência da ação microbiana. A qualidade da matéria-prima diretamente relacionada à fermentação relaciona-se ao teor de sacarose e de outros componentes do caldo. Dentre estes, destacam-se pela influência negativa os subprodutos do metabolismo microbiano, decorrentes da contaminação; principalmente os ácidos láctico e acético, além do glicerol e manitol, bem como o gás carbônico e os antibióticos utilizados no controle microbiano (FELIPE, 2008).

Desde o início do Proálcool, foi possível aumentar o rendimento do processo (kg etanol/kg de açúcar alimentado) de 82% (em 1970) para 91-2% (em 1999), patamar que não vem sendo ultrapassado há 10 anos (FELIPE, 2006). Apesar de maduro e otimizado em vários aspectos, contaminações bacterianas e a decorrente produção de ácidos e outros são um dos principais entraves ao aumento do rendimento em etanol. Inibem a fermentação e a viabilidade das leveduras, causando redução significativa do produto final em detrimento dos subprodutos indesejáveis (OLIVA-NETO, 2008). Experimentalmente se observam decréscimos de rendimento da ordem de 30% (BISCHOFF et al., 2009).

O conhecimento sobre a diversidade bacteriana responsável pelas cofermentações é incipiente, sendo baseado nos métodos dependentes de cultivo. Os níveis de ácido lático observados são proporcionais à abundância de bactérias láticas, dentre as quais se sobressaem diversas espécies de lactobacilos (SCHELL et al., 2007; AMORIM, 2005). A maior discrepância na taxonomia deste gênero é que não há correlação entre as propriedades metabólicas e a localização filogenética, resultando na ineficácia dos testes bioquímicos para identificação (FELIS & DELLAGLIO, 2007). Além disso, há espécies novas (em potencial) a serem descritas, o que irá aprimorar a microbiologia desta fermentação. As amostras não identificadas podem chegar a mais de 40% dos isolados, além dos lactobacilos cuja identificação não alcança o nível de espécie (em cerca de 20% das amostras) (SKINNER-NEMEC, NICHOLS & LEATHERS, 2007; SKINNER & LEATHERS, 2004). Adicionalmente, a despeito dos inúmeros malefícios decorrentes da presença bacteriana, algumas espécies podem ser inócuas (BISCHOFF et al., 2009) e uma associação particular - *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus vini* –

mostrou-se favorável em uma planta industrial. Após três semanas de iniciado o processo, nas quais houve interrupções em decorrência de infecções, observou-se sua estabilização acompanhada por alterações na morfologia das leveduras. O processo manteve-se estável, em termos de eficiência, produtividade e formação de sub-produtos, por mais de dois anos. Contagens celulares e identificação molecular baseada em seqüências ribossomais revelaram a prevalência de *D. bruxellensis*, a despeito da inoculação com levedura de panificação; e *L. vini*, espécie não detectada no inóculo, na água do processo e tampouco nas linhas de sacarificação (PASSOTH, BLOMQVIST & SCHNÜRER, 2007). Portanto, é notória a importância do estudo da diversidade de bactérias associadas com o processo produtivo do bioetanol.

Nesse contexto, foi considerada estratégica a implementação de uma metodologia de identificação de procariontes que garantisse a descrição das espécies novas, dispensando o envio de amostras para centros de referência especializados na Europa ou Estados Unidos e que pudesse ser sistematicamente utilizada para identificar isolados da cadeia produtiva do bioetanol.

Para os ensaios de estabelecimento da nova metodologia foi imprescindível a eleição de um sistema cujos parâmetros-chave para a descrição de espécies bacterianas estivessem fartamente documentados de acordo com a metodologia convencional e atual padrão ouro em taxonomia de procariontes, de modo a validar os resultados obtidos. Por este motivo, todas as etapas de implementação da nova metodologia foram desenvolvidas com vibrios patógenos de corais, sistema amplamente estudado e cujos valores de hibridização DNA-DNA (HDD), segundo o método de referência, bem como o conteúdo de guanina e citosina (%GC) do genoma estão disponíveis para consulta na literatura científica (THOMPSON et al.,2009; GOMEZ-GIL et al., 2004a; BEN-HAIM et al., 2003; THOMPSON et al., 2003a, 2003b; SAWABE et al., 1998 e outros). Como o método é baseado nas propriedades físico-químicas do DNA, é evidente que terá aplicação ampla no universo procarionte.

Dentre as vantagens, a técnica estabelecida prima pela rapidez, acurácia e relação custo/benefício atraente. O controle de espécies deletérias e a elucidação de

aspectos importantes da ecologia microbiana são dependentes de informações taxonômicas precisas, base para estudos de biodiversidade. A metodologia ora apresentada pode preencher uma lacuna significativa no entendimento do processo bioetanol e contribuir para adoção de soluções tecnológicas visando, no mínimo, reduzir perdas, mas preferencialmente incrementar o rendimento. Outrossim, cabe ressaltar sua aplicabilidade para, em princípio, quaisquer outros sistemas envolvendo procariontes. A pesquisa realizada se insere de forma relevante tanto no campo da taxonomia de procariontes quanto do desenvolvimento do processo bioetanol, reforçando a interação entre o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biologia e o Laboratório de Engenharia Bioquímica e Desenvolvimento de Bioprocessos da Escola de Química.

Capítulo 2

Taxonomia microbiana: rumo a uma alternativa à hibridização de DNA clássica

A identificação rápida e confiável de linhagens é a mais importante tarefa da taxonomia (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). No âmbito acadêmico, é responsável pela classificação (criação de novos *taxa*), identificação (alocação de linhagens nas espécies conhecidas) e por designar nomes às linhagens segundo a nomenclatura binomial lineana (VANDAMME et al., 1996). Como ferramenta é imprescindível na metrologia de material microbiológico, sendo os processos de autenticação, quantificação e diagnóstico baseados nos preceitos e nas metodologias estabelecidas, validadas e empregadas em taxonomia microbiana.

Métodos e tecnologias em taxonomia vêm sendo desenvolvidos, principalmente, por coleções de culturas de referência. O constante depósito de material de variadas origens estimula o refinamento de esquemas de classificação e identificação. A reputação destas coleções está relacionada à sua confiablidade enquanto bancos de culturas, mas também, e sobremaneira, ao conjunto de serviços oferecidos e ao **desenvolvimento de práticas modernas em taxonomia**. Centros com projeção internacional são a *American Type Culture Collection* (ATCC) *e United States Department of Agriculture Culture Collections* (USDA) nos Estados Unidos; a *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms* (BCCM), na Bélgica; a *Centraalbureau vor Schimmecultures* (CBS), na Holanda; a *German National Resource Centre for Biological Material* (DSMZ), na Alemanha; e a *Japan Collection of Microorganisms* (JCM), no Japão (TAUTZ et al., 2003). No Brasil ainda há uma lacuna neste campo de atuação.

2.1 Taxonomia microbiana e processos fermentativos

Processos levados a cabo por agentes biológicos são denominados bioprocessos, processos biotecnológicos ou processos fermentativos, quando conduzidos por microrganismos (ocorrentes ou recombinantes). São ainda consideradas sinonímias, as expressões processos com células animais e vegetais, processos enzimáticos ou os tratamentos biológicos de resíduos e efluentes. Processos fermentativos aproveitam a fantástica versatilidade metabólica dos microrganismos e são fonte de produtos importantes na indústria química, alimentícia, médico-farmacêutica, e de biocombustíveis. Além disso, são processos mais limpos, de baixo impacto ambiental e suplantam tecnologias que contribuem para a depleção de recursos finitos (PEREIRA JR, BON & FERRARA, 2008).

No Brasil, por meio do decreto lei nº 6.041 (Brasil, 2007), foi instituída a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, com ênfase no desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos. Dentre as justificativas para a iniciativa foi salientado que diversos setores da economia já contam com a interação dos processos e produtos biotecnológicos em suas atividades e resultados, movimentando vários milhões de dólares nos últimos anos e que a notável biodiversidade do país é outro diferencial competitivo para o desenvolvimento da biotecnologia. A produção de biocombustíveis consta dentre os objetivos, para a manutenção da liderança internacional do Brasil nesta área. Diversos processos fermentativos foram enumerados como alvos estratégicos, incluindo aqueles para produção de enzimas; de compostos C1 (a partir de CO_2, metano residuais, etc.); para produção de metano destinado à geração de energia elétrica, combustão veicular e para síntese de outros produtos; e outros processos fermentativos a partir de açúcar e/ou álcool (ácido acético, butanol, etc.). Para o pleno aproveitamento destas oportunidades, é fundamental que culturas puras e autenticadas estejam prontamente disponíveis (nas coleções *ex situ*) para o desenvolvimento de projetos tecnológicos, além de uma gama de conhecimentos associados, como procedimentos de isolamento, cultivo e manutenção dos organismos, preservação de longo termo do material e suas características de interesse (TAUTZ et al., 2003).

Além da preservação, uma classificação apropriada tem de estar baseada em processos rigorosos a fim de garantir reprodutibilidade ao processo, especialmente nos casos de produtos sujeitos a regras rígidas de biossegurança e propriedade industrial. A eficiência destes processos também pode ser dramaticamente afetada por contaminações (THOMPSON et al., 2005). Atualmente, além dos requerimentos em relação ao custo/benefício, exigências crescentes quanto à reprodutibilidade e confiabilidade vêm aumentando a necessidade de melhoria no monitoramento e controle dos bioprocessos (PEREIRA JR, BON & FERRARA, 2008).

O desenvolvimento da biotecnologia, especificamente de produtos e processos que envolvem microrganismos, requer uma identificação microbiana precisa (THOMPSON et al., 2005a; TAUTZ et al., 2003).

2.2 Avanços na identificação de procariontes: da morfologia ao MLSA

Atualmente a identificação de procariontes baseia-se na proposta polifásica de Rita Colwell (1970), à época, um divisor de águas. Anteriormente prevaleciam esquemas de classificação que supervalorizavam características morfológicas e testes fenotípicos, herança dos botânicos estudiosos de algas, e que resultaram na formatação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos, muitas vezes artificiais[1]. No trabalho de Colwell (ibid), a constatação inequívoca da correlação direta entre fenótipo e similaridade entre genomas, comparados segundo a técnica de hibridização DNA-DNA (HDD) (Fig. 2.1), resultou na consensual aplicação sistemática desta abordagem. É uma abordagem pragmática que visa à classificação com o mínimo de contradições por meio da integração de dados fenotípicos e genotípicos (VANDAMME et al., 1996).

[1] Cf. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1923.

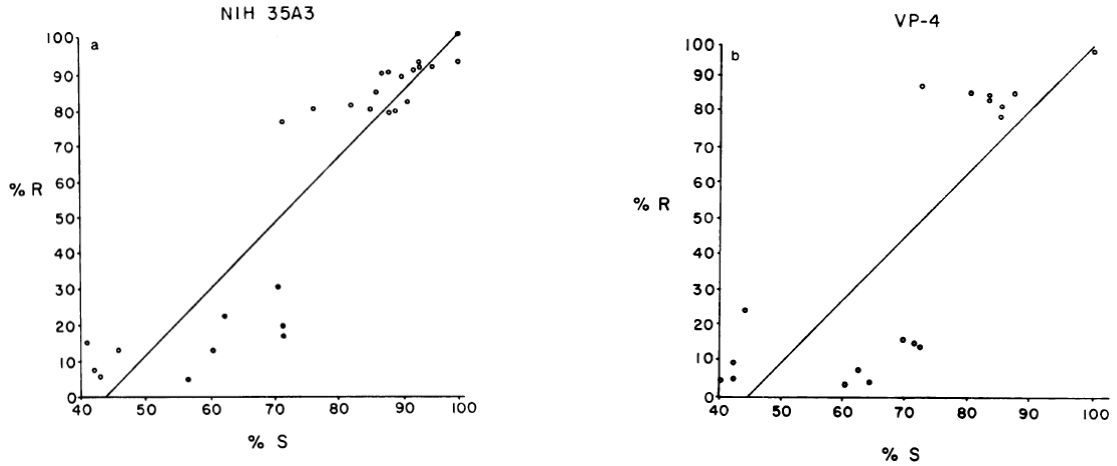

Figura 2.1: Correlação direta entre os valores de similaridade baseados em 200 características fenotípicas (%S) e os valores de reassociação de ácidos nucléicos (%R) para linhagens de **vibrios**. **ESQUERDA**: *V. cholerae*; **DIREITA**: *V. parahaemolyticus*. (Adaptado de Colwell, 1970)

Foi possível a construção de grupos taxonômicos robustos, posteriormente alocados no espaço filogenético com o auxílio de seqüências do RNAr 16S (WOESE & FOX, 1977). O sistema produzido é estável, preditivo e informativo, útil nos mais diversos ramos de atividade, da clínica médica e agricultura à biotecnologia e autenticação microbiana (VANDAMME et al., 1996). Ainda hoje o RNAr 16S é o mais difundido cronômetro molecular na filogenia de procariontes (LUDWIG & KLENK, 2001). No entanto, a resolução deste gene, altamente conservado, é limitada quando espécies intimamente relacionadas são inspecionadas (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; FOX, WISOTZKEY & JURTSHUCK, 1992) e outros marcadores filogenéticos vêm sendo adotados alternativamente com sucesso (NASER et al., 2007, 2005; THOMPSON et al., 2005b). Nesse contexto, *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e genomas completos são eficazes na identificação e classificação microbiana (STACKEBRANDT et al., 2002).

O MLSA emprega um número mínimo, porém suficiente (n = 3 a 7) de genes essenciais (*housekeeping*) selecionados para, em conjunto, refletirem a similaridade do genoma completo (THOMPSON et al., 2007; GEVERS et al., 2006, 2005). Exemplos de genes comumente usados são os que codificam as seguintes proteínas indispensáveis ao metabolismo celular: cadeia α da fenilalanil-tRNA sintetase (*phe*S) uridilato quinase (*pyr*H), subunidade α da RNA polimerase (*rpo*A) e a subunidade α

da ATP sintase - complexo F1, ligado à membrana celular (*atp*A) (Naser et al., 2007; THOMPSON et al., 2005).

A informação sobre os genomas pode ser obtida diretamente através do sequenciamento do genoma completo, trabalho que se pretende evitar, quando o número de isolados bacterianos é elevado e havendo necessidade de agilidade na identificação. Indiretamente, a informação pode ser estimada a partir da similaridade entre DNAs genômicos e da composição de bases, por meio de ensaios de hibridização de DNA e da quantificação do conteúdo de bases, respectivamente. A composição de bases, expressa como conteúdo de guanina e citosina (mol% G+C ou %GC), tem valor taxonômico pela sugestão da variação genética máxima no âmbito de gênero e também de espécie. De acordo com dados acumulados, espera-se 10 a 12% de dissimilaridade entre espécies do mesmo gênero (PRIEST & AUSTIN, 1993). No entanto, dentre os lactobacilos, por exemplo, essa previsão não se aplica (32-53% GC) (FELIS & DELLAGLIO, 2007).

Em 1961, Schildkraut e colaboradores demonstraram ser possível a formação de DNA duplex a partir dos DNAs desnaturados de dois organismos diferentes com a condição de que a composição de bases destes organismos seja muito semelhante e que ambos sejam geneticamente relacionados. A partir deste marco, e com o avanço das técnicas, a definição de espécie foi remodelada com base nos resultados de experimentos de reassociação DNA-DNA. A grande vantagem prática destes métodos é que o continuum observado para os grupos definidos por características fenotípicas não se repetiu. Ao contrário, os genomas formaram grupos discretos, “clusters” de organismos intimamente relacionados (KRIEG, 1988 apud ROSELLÓ-MORA, 2006).

2.3 Estratégias para medir similaridade entre genomas

Há duas estratégias experimentais para medir a similaridade entre DNAs genômicos de linhagens relacionadas, por meio de reassociação DNA-DNA: (i) por determinação da razão de hibridização relativa (RHR) em ensaios de HDD (ZIEMKE

et al., 1998; JAHNKE, 1994; EZAKI et al., 1989; POPOFF & COYNAULT, 1980), ou (ii) por diferenças nos pontos médios de desnaturação térmica (ΔTm), método espectrofotométrico (DE LEY, CATTOIR & REYNAERTS, 1970) (Fig. 2.2).

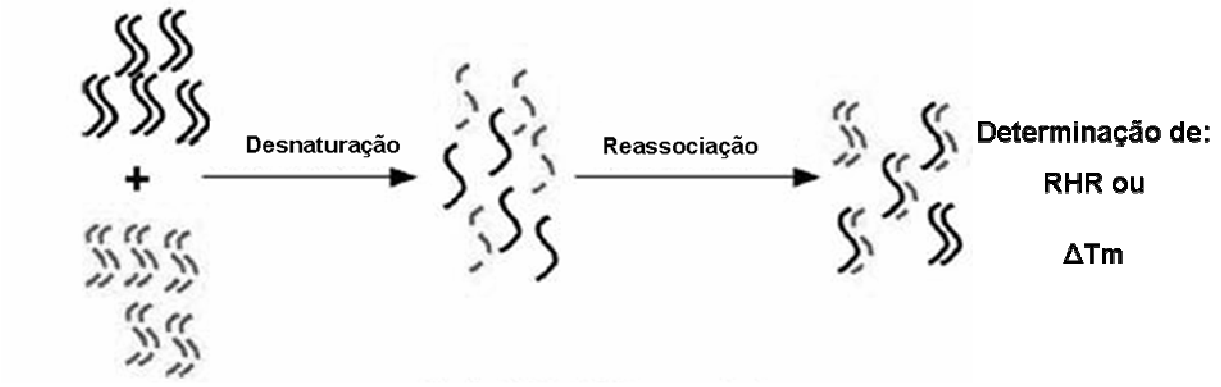

Figura 2.2: Estratégias experimentais de reassociação DNA-DNA (adaptado de Roselló-Mora & Amann 2001)

Um inventário de todas as publicações no ano de 2004 no periódico *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM), bíblia dos sistematas, ilustra quão freqüentemente são empregados os métodos de reassociação DNA-DNA (Tabela 2.1).

Foram 305 artigos compilando 351 descrições de espécies novas. 65% das espécies novas foram descritas com o uso de reassociação DNA-DNA. Das demais descrições (35%) 75% basearam-se em isolado único e mais da metade resultou na descrição de novo gênero. Nestes casos o racional para a descrição do *taxa* foi a dissimilaridade de seqüências do RNAr 16S (ROSELLÓ-MORA, 2006). Cabe sublinhar que nos casos de novos gêneros a reassociação DNA-DNA pode ser dispensada, pois esta abordagem é indicada para a discriminação de linhagens relacionadas, ou seja, com mais de 97% de similaridade na seqüência do rRNA 16S.

Tabela 2.1: Números absolutos e porcentagens de artigos ou novas descrições publicados nos seis números do volume 54 do IJSEM, durante 2004 (Adaptado de ROSELLÓ-MORA, 2006).

Artigos com novas descrições	**305**	
Artigos com experimentos de reassociação	199	65%[a]
Artigos sem experimentos de reassociação	106	35%[a]
Experimentos de reassociação espectrofotométricos	67	34%[b]
Hibridizações em microplacas (método não radioativo)	96	48%[b]
Métodos não radioativos por filtração (quimioluminescência)	9	5%[b]
Métodos com filtro radioativo, S1 ou hidroxiapatita	27	14%[b]
Novas espécies	351	
Novas espécies com isolado único	191	54%[c]
Novo gênero	65	
Novo *candidatus*	17	

[a] porcentagens referentes aos 305 artigos com novas descrições
[b] porcentagens referentes aos 199 artigos nos quais foram realizados experimentos de reassociação
[c] porcentagens referentes ao total das 351 espécies novas classificadas

Dentre as técnicas de reassociação DNA-DNA empregadas, foram prevalentes os métodos não radioativos (53%), seguidos do método espectrofotométrico (34%). Ao todo 48% dos estudos foram realizados pelo método não radioativo em microplacas (Tabela 2.1).

2.3.1 Hibridização DNA-DNA (HDD)

A HDD vem sendo usada há cerca de 40 anos e ainda hoje vigora como padrão ouro na identificação e autenticação microbiana, conforme recomendação dos comitês *ad hoc* de especialistas (STACKEBRANDT et al., 2002; WAYNE et al., 1987).

A estratégia consiste em fixar DNA fita simples (DNAfs) de alta massa molecular em suporte sólido e então incubar na presença de DNAfs, de baixa massa molecular e marcado. Os procedimentos de marcação incluem o uso de radioisótopos ou baseiam-se no uso de biotina (PRIEST & AUSTIN, 1993). Métodos

radioativos são cada vez menos adotados (Tabela 2.1). Esta metodologia freqüentemente é realizada em microplacas (Tabela 2.1), seguindo Ezaki e colaboradores (1989). O preparo do DNA marcado é laborioso, dispendioso e demorado. Dentre estas desvantagens, o fator crítico e limitante ao amplo uso deste método é o tempo necessário para a execução dos ensaios: no mínimo duas semanas para um conjunto de quatro linhagens (WILLEMS et al., 2001). No Brasil, a demanda de tempo para a descrição de espécies novas é ainda maior, pois requer o envio de material microbiológico para os centros de referência que oferecem esse serviço, tais como as coleções BCCM e DSMZ. Ambas reputam excelência na prática da taxonomia microbiana.

Uma alternativa promissora ao método clássico é o uso de plataformas de PCR em tempo real (rtPCR) para avaliação fluorimétrica da similaridade entre genomas, com base na desnaturação térmica do DNA (GONZALEZ & SAINT-JIMENEZ, 2005).

2.3.2 Desnaturação térmica do DNA e ΔTm

Nesta abordagem compara-se a estabilidade térmica de DNA fita dupla (DNAfd) híbrido, com aquela de DNAfd homólogo. Em condições padronizadas (tampão citrato padrão), a desnaturação de DNAfd é função da temperatura. A temperatura na qual 50% do DNAfd inicial encontra-se desnaturado é denominada ponto médio da desnaturação térmica, ou temperatura média de desnaturação (Tm). O parâmetro usado para estimar o relacionamento entre DNAs de duas linhagens relacionadas é a diferença entre a Tm do DNA da linhagem de referência (homólogo) e a do híbrido, denominada delta Tm (ΔTm) (DE LEY, CATTOIR & REYNAERTS, 1970).

As medidas de RHR e ΔTm, de 111 pares de linhagens de diferentes grupos taxonômicos, divulgadas durante o ano de 1999, no *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB), foram correlacionadas, tendo sido constatada a boa correlação entre estes parâmetros é (ROSELLÓ-MORA & AMANN 2001) (Fig. 2.3).

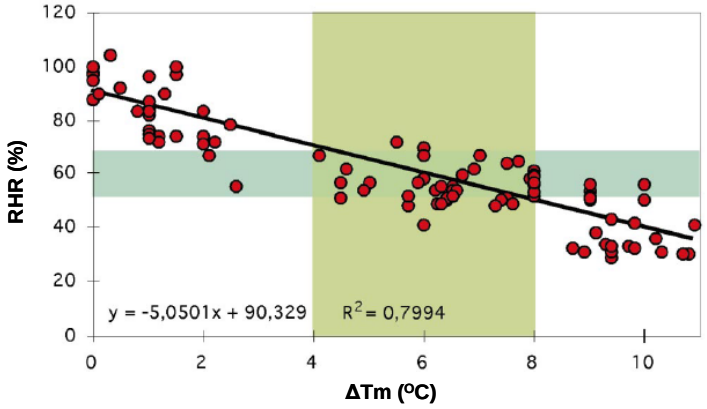

Figura 2.3: Correlação entre os valores de RHR e ΔTm referentes a 111 pares de linhagens, de diferentes grupos taxonômicos, disponibilizados no volume 49 do periódico especializado IJSB, de 1999. As áreas hachureadas indicam os intervalos nos quais é mais provável a observação de medidas discrepantes. A área hachureada em azul refere-se às medidas de RHR e a área hachureada em verde refere-se às medidas de ΔTm (Adaptado de Roselló-Mora & Amann 2001).

Quanto aos limites para delineação de espécie, 15 peritos reforçaram em 2002 (STAKEBRANDT et al.) as premissas estabelecidas em 1987 e baseadas em numerosos estudos realizados com espécies de procariontes bem definidas:

> *In practice, DNA reassociation approaches the sequence standard and represents the best applicable procedure at the present time. The phylogenetic definition of species generally would include strains with approximately* ***70% or greater DNA-DNA relatedness and with 5°C or less ΔTm****. Both values must be considered. Phenotypic characteristics should agree with this definition* [...] (Wayne et al., 1987, p. 463, grifo nosso)

Os dados experimentais reunidos na Figura 2.3 corroboram tais limites: geralmente valores de ΔTm inferiores a 4-5 ^{o}C correspondem a valores de RHR superiores a 50%; enquanto aqueles valores de ΔTm superiores a 8-9 ^{o}C, correspondem a valores de RHR inferiores a 50%.

Uma vantagem da estimativa de ΔTm em relação à RHR é que as medidas de ΔTm independem do método usado para hibridização do DNA (contanto que o tampão de hibridização seja mantido) enquanto que a porcentagem de reassociação pode ser fortemente afetada pelas condições de hibridização (GRIMONT et al., 1980). Para estimar a ΔTm, o DNAfd da linhagem de referência (homólogo) e o DNAfd constituído por uma fita deste DNA e outra fita do DNA de outra linhagem

relacionada (híbrido) devem ser desnaturados. A absorbância da solução deve ser medida conforme os DNAs homólogo e híbrido são aquecidos progressivamente.

A absorbância (*A*) de uma solução de DNA aumenta com a temperatura até as fitas se separarem completamente, quando se registra absorbância máxima - de acordo com o efeito hipercrômico – e permanece constante mesmo que a temperatura continue aumentando. As bases nitrogenadas são responsáveis pela maior parte dessa absorção, que é máxima quando o comprimento de onda (λ) é 260 nm ($A_{max} = A_{260}$). Quando as bases se encontram totalmente expostas (DNA desnaturado), o aumento da temperatura deixa de modificar a absorbância (ZAHA, FERREIRA & PASSAGLIA, 2003). Nos ensaios de ΔTm, a A_{max} (100% de absorbância) é observada ao final do experimento, e a Tm (correspondente a 50% de absorbância), é o ponto médio da curva A_{260} (nm) x T (^{o}C). Uma desvantagem deste método é a medida de absorbância, cuja sensibilidade pode ser fator crítico, além do requerimento de um espectrofotômetro térmico (GONZALEZ & SAIZ-JIMENEZ, 2005).

Em um estudo com hipertermofílicos, foi proposto o uso de plataforma de rtPCR para avaliar fluorimetricamente a ΔTm de linhagens relacionadas. Nesse estudo o fluoróforo SYBR GREEN I (SYBR), que tem alta afinidade por DNAfd, foi incorporado às soluções de DNA homólogo e híbrido. A máxima emissão de luz pelo SYBR (λ = 520nm) se dá quando associado a DNAfd. Durante a desnaturação o SYBR se dissocia do DNA e o decréscimo na emissão de luz, proporcional à desnaturação do DNA, foi usado para estimar a ΔTm entre as espécies estudadas (ibid) (Fig. 2.4).

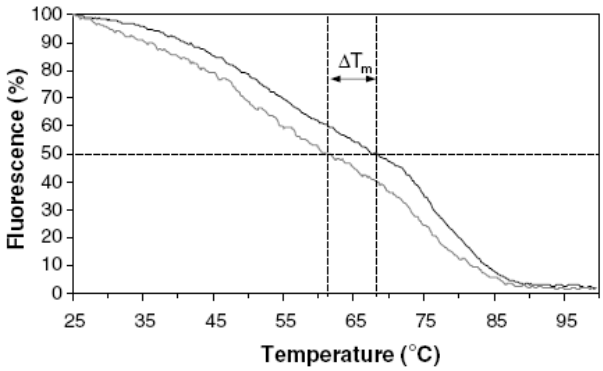

Figura 2.4: Desnaturação térmica do DNA genômico de *Pyrococcus horikoshii* (curva em preto) e do DNA híbrido de *P. horikoshii e P. endeavori* (curva em cinza) na presença de SYBR , em plataforma de rtPCR (iCYCLER, BIORAD). O intervalo demarcado pela seta dupla é a ΔTm entre os pares de linhagens (Adaptado de Gonzalez & Saiz-Jimenez, 2005).

Nesses ensaios a fluorescência máxima é observada ao início do experimento. Os valores de Tm dos DNAs homólogo e híbrido foram obtidos como a temperatura correspondente a 50% de decréscimo na fluorescência, tendo sido encontrados no ponto médio da curva de F (%) x T (^{o}C) (GONZALEZ & SAIZ-JIMENEZ, 2005). Valores de ΔTm entre homólogo e híbrido superiores a 5 ^{o}C devem ser considerados como correspondentes a espécies distintas (STACKEBRANDT et al., 2002; WAYNE et al., 1987).

A tecnologia da PCR quantitativa em tempo real (qrtPCR) foi introduzida nos anos 90 (HEID et al., 1996; HOLLAND *et al.*, 1991). A plataforma de instrumentação combina termociclador - com sistema de aquecimento e resfriamento altamente eficiente - e um sistema ótico capaz de emitir e captar luz nos comprimentos de onda de excitação e emissão de diferentes fluoróforos cuja fluorescência aumenta quando associados a DNAfd (HIGUCHI et al., 1993, 1992). Os sinais luminosos são decodificados por um *software* associado e transformados em imagem e dados. De imediato, os ganhos em acurácia e rapidez no diagnóstico e detecção se traduzem no crescente número de publicações científicas na última década – cerca de 40 mil em fevereiro de 2010 (PUBMED, 2010) - e na relativa popularização dos equipamentos, com diversas opções no mercado: Biorad, Applied Biosystems, Eppendorf, Roche, GE Healthcare, etc. (BONETTA, 2005). Em 2008, foi divulgado o uso de plataforma de rtPCR na taxonomia microbiana, na caracterização de novas espécies (JURADO *et al.,*2008), segundo o método sugerido por Gonzalez & Saiz-Jimenez (2005).

2.4 Medida do conteúdo de GC em plataforma de PCR em tempo real

A %GC é um dos itens recomendados para a descrição formal de espécies de procariontes (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001; PRIEST & AUSTIN, 1993). Neste universo a amplitude é de 18 a 76 %GC (FADIEL, LITHWICk & NAFTOLIN 2005; PRIEST & AUSTIN, 1993).

Anteriormente aos ensaios de ΔTm, é necessária a obtenção do DNA híbrido, cuja curva de desnaturação é comparada àquela do DNA homólogo (Seção 2.3.2). Para tal, uma mistura do DNA da linhagem de referência com o de outra linhagem relacionada devem ser desnaturados e renaturados à temperatura ótima de renaturação (T_{OR}). A T_{OR} pode ser calculada em função da %GC (DE LEY, CATTOIR & REYNAERTS, 1970). Portanto, este parâmetro deve ser previamente conhecido para os genomas das linhagens que se pretende obter a ΔTm. O cálculo da T_{OR} deve seguir a equação determinada experimentalmente por De Ley, Cattoir & Reynaerts (1970):

$$T_{OR} = 0{,}51\ (\%GC) + 47{,}0 \quad (1)$$

A desnaturação e a renaturação térmicas do DNA são fenômenos físicos e químicos e referem-se à fusão e reanelamento da molécula, respectivamente. A estabilidade da hélice dupla do DNA depende da proporção de GC em relação à AT (adenina e timina), ou vice-versa. Quanto maior a %GC, mais energia (calor) será necessária para desnaturar a molécula, pois essas bases mantêm-se pareadas por meio de três ligações de hidrogênio, uma a mais que as bases AT. Similarmente, a temperatura ótima para a renaturação, ou hibridização, também é dependente da %GC (ZAHA, FERREIRA & PASSAGLIA, 2003).

Dentre as técnicas padrão para estimar a %GC se inclui o método direto - sequenciamento do genoma completo - que não se justifica exclusivamente para esta finalidade. As duas outras abordagens são HPLC (*high pressure liquid cromatography*) e a desnaturação térmica, uma vez que a relação entre a temperatura de desnaturação (Tm) e a %GC é linear (DE LEY, CATTOIR & REYNAERTS, 1970; MARMUR & DOTY, 1962). As medidas realizadas por HPLC

são consideradas acuradas e confiáveis, porém o método é dispendioso, sendo necessário um sistema dedicado, o que só se justifica quando a medição é rotineira (TAMAOKA & KOMAGAWA, 1984). Além do uso de enzimas para preparação das amostras, medidas de absorbância durante a desnaturação térmica requerem um espectrofotômetro com controlador térmico, o que não é trivial.

Como alternativa ao uso do espectrofotômetro térmico, foram determinadas as variações fluorimétricas da desnaturação do DNA, em presença do fluoróforo SYBR, em plataforma de rtPCR (GONZALEZ & SAIZ-JIMENEZ, 2002). Nesse estudo foi construída uma curva de calibração na qual foram correlacionadas as Tms (^{o}C), obtidas experimentalmente, de espécies bacterianas cujo genoma completo já foi seqüenciado (n =11) com sua %GC, obtida dos dados do sequenciamento. Conforme esperado, foi observada uma relação linear direta entre os parâmetros (R^2 = 0,99):

$$\%GC = 1,98\ Tm - 106,91 \quad (2)$$

Os experimentos também foram conduzidos na presença de formamida. Nesta condição as Tms foram significativamente inferiores, tendo sido preservada a relação linear direta com a %GC (R^2 = 0,98; equação 3). Com a inclusão deste agente desnaturante, é possível a medição da %GC de linhagens de alto conteúdo de GC, para as quais a Tm se aproximaria da temperatura de ebulição da mistura reacional (DNA e SYBR em tampão citrato).

$$\%GC = 1,99\ Tm - 71,08 \quad (3)$$

O sistema permite a estimativa da %GC de quaisquer genomas de procariontes, tanto para efeito de sua caracterização e/ou descrição quanto para realização dos ensaios de ΔTm.

Capítulo 3

Diversidade microbiana

O estudo da biodiversidade microbiana deve repousar sobre sólidos alicerces e práticas taxonômicas de ponta para produzir informações relevantes e úteis. Com base nos recentes desenvolvimentos tecnológicos relatados e de acordo com os critérios e necessidades abordados no Capítulo 1, foram elencados para estudo os seguintes sistemas:

3.1 Bactérias láticas contaminantes do processo bioetanol

A fermentação alcoólica no processo bioetanol

A produção de bioetanol de cana-de-açúcar normalmente é conduzida paralelamente à produção de açúcar e compreende o processamento da cana e a extração do caldo, o preparo do meio de cultivo e do inóculo inicial ou pé-de-cuba, a fermentação alcoólica, a recuperação das células (processo Melle-Boinot) e a destilação (Fig. 3.1) (BRUGNARO & SBRAGIA, 1986).

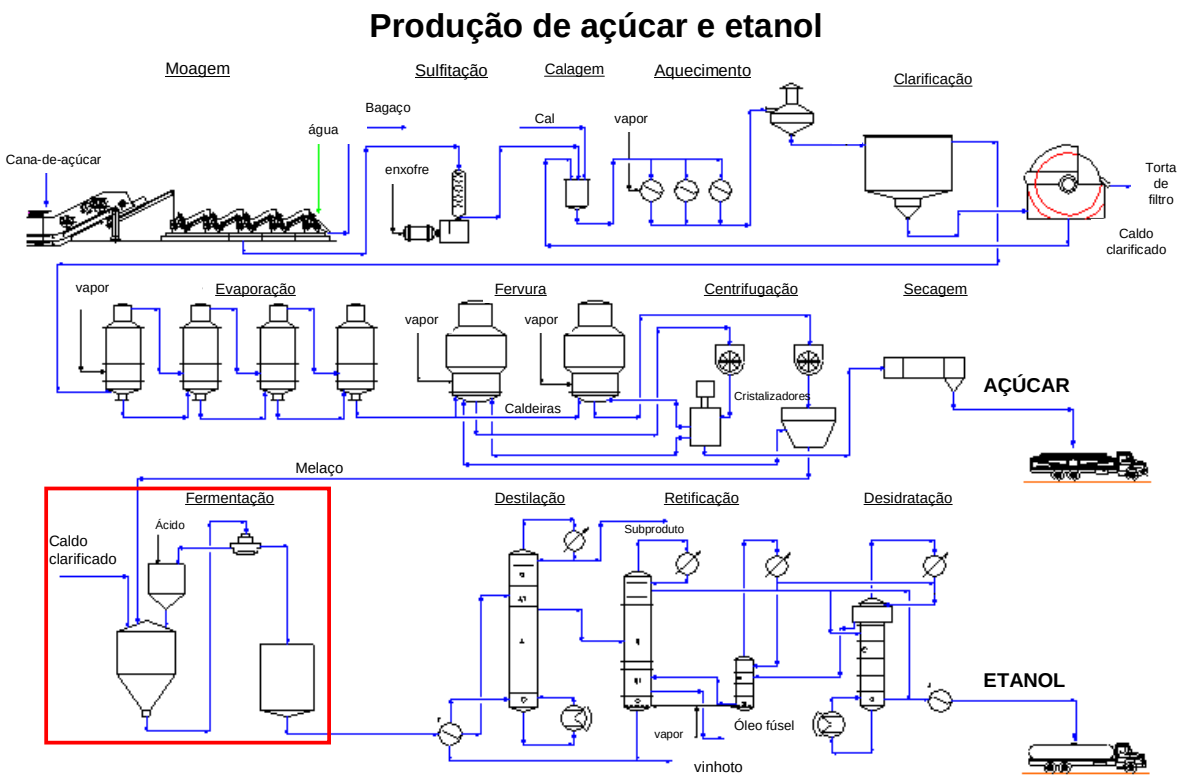

Figura 3.1: Fluxograma da produção de açúcar e álcool com destaque para o processo fermentativo,emoldurado em vermelho (adaptado de Brugnaro & Sbragia, 1986)

Muitos microrganismos são capazes de utilizar açúcares para produzir etanol através de processo fermentativo. Industrialmente, as linhagens de maior interesse são as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *S. uvarum*. Os atributos desejáveis para uma cepa de uso industrial são a rapidez de fermentação, alta tolerância ao álcool, osmotolerância, termotolerância e atividade celular em ambiente ácido (AMORIM, 2005; BORZANI, 2001). A conversão ocorre sob anaerobiose e resulta de uma série de 12 reações bioquímicas conjuntamente denominadas via *Embden-Meyerhof*. A reação estequiométrica global resulta na produção de 2 mol de etanol, 2 mol de CO_2 e 2 mol de ATP, por mol de glicose fermentada, conforme a equação química:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 \quad (5)$$

Uma baixa tensão de O_2 (0,05 a 0,10 mmHg) é indispensável à síntese de componentes celulares pela levedura. Valores superiores promovem o crescimento

celular à custa da produtividade em etanol (efeito Pasteur). A manutenção e o crescimento celular impedem a obtenção do rendimento teórico previsto pela equação (5). Em termos mássicos, cada grama de glicose poderia ser convertida em 0,511g de etanol e 0,489g de CO_2. Contudo, o rendimento real (ou rendimento de Pasteur) é afetado por reações secundárias e estimado de modo diverso conforme o autor (BORZANI, 2001) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Distribuição dos produtos da fermentação alcoólica por S. cerevisiae, em g/100g de glicose e rendimento real, estimado segundo diferentes autores (adaptada de BORZANI, 2001):

Produtos da fermentação	Pasteur 95%	Jackman, 1987 90-95%	Basso et al., 1996 85-92%
Etanol	48,5	45,0 – 49,0	43,0 - 47,0
Gás carbônico	46,4	43,0 – 47,0	41,0 - 45,0
Glicerol	3,3	2,0 – 5,0	3,0 - 6,0
Ácido succínico	0,6	0,5 –1,5	0,3 -1,2
Ácido acético	x	0,0 – 1,4	0,1 – 0,7
Óleo fusel	x	0,2 – 0,6	x
Butilenoglicol	x	0,2 – 0,6	x
Biomassa	1,2	0,7 – 1,7	1,0 – 2,0

3.1.2 Microbiologia da fermentação no processo bioetanol

Além do agente da fermentação (espécie/linhagem e a concentração inicial), os contaminantes presentes (espécies/linhagens e concentração) integram o fator microbiológico na determinação do rendimento da fermentação alcoólica industrial[*] (AMORIM, 2005).

[*] Fatores de natureza física (temperatura e pressão) e química (pH, oxigenação, concentração de sais e inibidores) também influem no rendimento, porém não são foco do presente estudo, conforme exposição de motivos no Capítulo 1.

Quanto às leveduras, tradicionalmente, a safra é iniciada com fermento desidratado oriundo da indústria de panificação (partida direta). Essa estratégia permite uma partida rápida. A partir dos anos 90, constatou-se que as leveduras nativas substituem a espécie inoculada logo no início da safra. Constatou-se ainda que as leveduras isoladas da mesma unidade (em safras anteriores) são capazes de permanecer no processo. A partir dessa constatação, diversas usinas começaram a propagar a sua própria levedura para a partida. Estas são denominadas com as iniciais da unidade de origem, sendo exemplos as seguintes cepas de *S. cerevisiae*: BG 1 (Usina Barra Grande), CR1 (Usina Cresciumal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT -1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra) CL (Usina Clealco), entre outras (BASSO & AMORIM, 1995; BASSO et al., 1993).

A procedência dos contaminantes é a mesma das leveduras (nativas) presentes na fermentação, isto é, principalmente, a cana e a terra que a mesma introduz no processo. Contagens de bactérias isoladas dos tecidos da cana indicam a presença de 10^4 a 10^8 UFC/g. Um processo de fermentação considerado aceitável trabalha com níveis de bactérias da ordem de 10^5 células/mL. A recirculação da água de lavagem da cana é um fator determinante de concentrações superiores a esta. A reutilização das leveduras contribui para a persistência da contaminação (SKINNER-NEMEC, NICHOLS & LEATHERS, 2007; ANDRIETTA, MGS; STECKELBERG & ANDRIETTA, SR; 2006; LUDWIG, OLIVA-NETO & DE ANGELIS, 2001).

Contaminantes presentes no mosto e nos reatores realizam fermentações secundárias, principalmente lática e acética, mas também dextrânica, butírica e levânica. Todas as fermentações secundárias utilizam direta ou indiretamente o açúcar. As bactérias láticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis, especialmente, o gênero *Lactobacillus*, resistente ao etanol, baixo pH e às temperaturas elevadas do processo (SCHELL et al., 2007; AMORIM, 2005). Além de competirem pelo substrato, consumindo açúcar, nutrientes e o produto (etanol), os contaminantes também produzem toxinas que provocam queda da viabilidade e morte das leveduras e contribuem para a cofloculação das leveduras (LUDWIG, OLIVA-NETO & DE ANGELIS, 2001; THOMAS, HYNES & INGLEDEW, 2001; AMORIM, 1981).

A cofloculação resulta no assentamento das leveduras ao fundo das dornas o que prejudica a conversão do açúcar em etanol, pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio. Também pode causar perda de células, pois a falta de homogeneidade do vinho fermentado impede a operação eficiente das centrífugas. Da perda de biomassa resulta consumo de substrato para reposição celular, com decréscimo de rendimento alcoólico. Outra conseqüência é o aumento da população bacteriana pois fica dificultado o contato entre o antibacteriano usado no processo e as células bacterianas , o que, por sua vez,, promove aumento de acidez, afetando as leveduras e a qualidade do etanol produzido. Espécies de lactobacilos vêm sendo recorrentemente isoladas de fermentações floculadas*. L. fermentum* foi a primeira espécie associada à floculação, mas já foi verificado que *L. plantarum*, *L. bucheneri* e outros também estão relacionadas ao fenômeno. Diversos trabalhos vêm sendo realizados visando à caracterização e quantificação da floculação promovida por *L. fermentum* em fermentações alcoólicas (SCHELL et al., 2007; MISSAWA et al., 2007; YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991).

Medidas da concentração de ácido lático por meio de HPLC indicam rapidamente a presença e a atividade de bactérias láticas no sistema, porém não revelam as espécies presentes no processo. Isto dificulta o tratamento e a eliminação dos contaminantes. Atualmente, o controle é inespecífico e inclui a lavagem da cana, evitando reuso da água, pasteurização do meio de cultivo e adição de ácidos e/ou antibióticos (penicilina, estreptomicina, tetraciclina, virginiamicina, ampicilina, e nisinas) nos reatores. Estes procedimentos encarecem o processo, além disto, podem selecionar linhagens resistentes aos antimicrobianos (LEJA & BRODA, 2009; SCHELL et al., 2007; BISCHOFF, SKINNER-NEMEC & LEATHERS, 2007; NICHOLS, SKINNER-NEMEC & LEATHERS, 2007; AMORIM, 2005).

A identificação e caracterização de bactérias láticas presentes na cadeia produtiva do bioetanol podem contribuir para otimizar o controle da contaminação bacteriana nesse setor estratégico da economia nacional.

Bactérias Gram-positivas, catalase-negativas e que produzem ácido lático como principal produto final da fermentação de carboidratos são denominadas Bactérias do Ácido Lático (BAL). O gênero *Lactobacillus* é o mais amplo e heterogêneo dentre as BAL (DE VUYST & VANCANNEYT, 2007).

3.1.3 Taxonomia de lactobacilos

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae, grupo monofilético no qual também estão incluídos os gêneros mais próximos *Paralactobacillus* e *Pediococcus*. A família mais próxima é *Leuconostocaceae* que compreende os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella* (Fig. 3.2) (GARRITY, BELL & LILBURN, 2004).

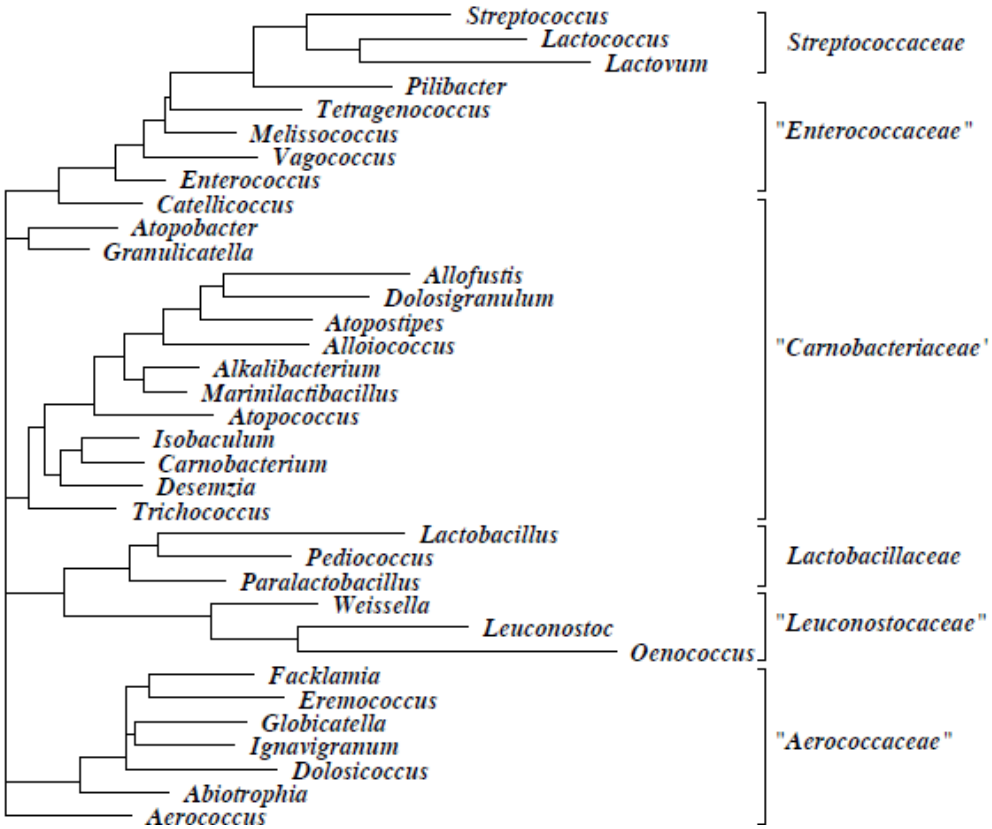

Figura 3.2: Famílias da ordem *Lactobacillales*, incluindo *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. Árvore baseada em seqüências do **RNAr 16S** de aproximadamente 1400 nts tendo sido os dados e as ferramentas de análise subsidiados por SILVA *comprehensive ribosomal RNA databases* (Adaptada de Ludwig, Schleifer & Whitman**,** 2009).

Atualmente são reconhecidas 167 espécies, sendo *Lactobacillus delbrueckii* (Leichmann 1896) Beijerinck 1901 a espécie tipo (EUZÉBY, 2010). A divisão clássica do gênero era baseada no metabolismo de carboidratos e características fisiológicas e distinguia apenas três grupos de espécies. Foi elaborada com intuito de atender às necessidades da microbiologia de alimentos (STILES & HOLZAPFEL, 1997). Contudo, análises filogenéticas baseadas em sequências do RNAr 16S evidenciaram discrepâncias nesta classificação fenotípica (SCHLEIFER & LUDWIG, 1995) e permitiram o reconhecimento de pelo menos 8 sub-grupos: grupo do *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. casei* e do *L. salivarius*. Estes grupos de espécies estão ilustrados na árvore filogenética construída com seqüências totais do RNAr 16S de 201 linhagens tipo, representativas da diversidade do gênero, em trabalho recente de Naser e colaboradores (2007) (Fig. 3.3). Entretanto, é inviável a identificação de espécies que divergiram recentemente com base na dissimilaridade de seqüências do RNAr 16S. Nesses casos vem sendo adotado o sequenciamento de genes essenciais, com destaque para o *phe*S, que frequentemente distingue linhagens da mesma espécie (SCHEIRLINCK et al., 2009; BLAIOTTA et al., 2008; NASER et al., 2007). Quanto à variabilidade interespecífica, o poder discriminatório deste gene, na maioria dos casos é superior a 10%. Em relação à topologia desenhada pelo RNAr 16S, cada um dos subgrupos *L. acidophilus*, *L. buchneri* e *L. salivarius* se ramifica em dois (NASER et al., 2007).

A descrição de novas espécies de lactobcilos também vem alterando significativamente a estrutura do gênero e sua taxonomia vem acompanhando a evolução das técnicas de biologia molecular, porém ainda não pode ser considerada satisfatória e estabelecida (COUDEYRAS et al., 2008; DE VUYST & VANCANNEYT, 2007; FELIS & DELLAGLIO, 2007). Até 2009 haviam sido publicadas 10 seqüências genômicas completas de lactobacilos e cerca de 11 projetos estavam em andamento. Pela discrepância entre os dados genômicos e aqueles gerados por seqüências ribossomais - apesar do pequeno percentual de genomas seqüenciados - o prognóstico é que a conclusão dos projetos em curso, e outros, resulte em reformulações no esquema corrente (CLAESSON, VAN SINDEREN & O'TOOLE, 2008; FELIS & DELLAGLIO, 2007).

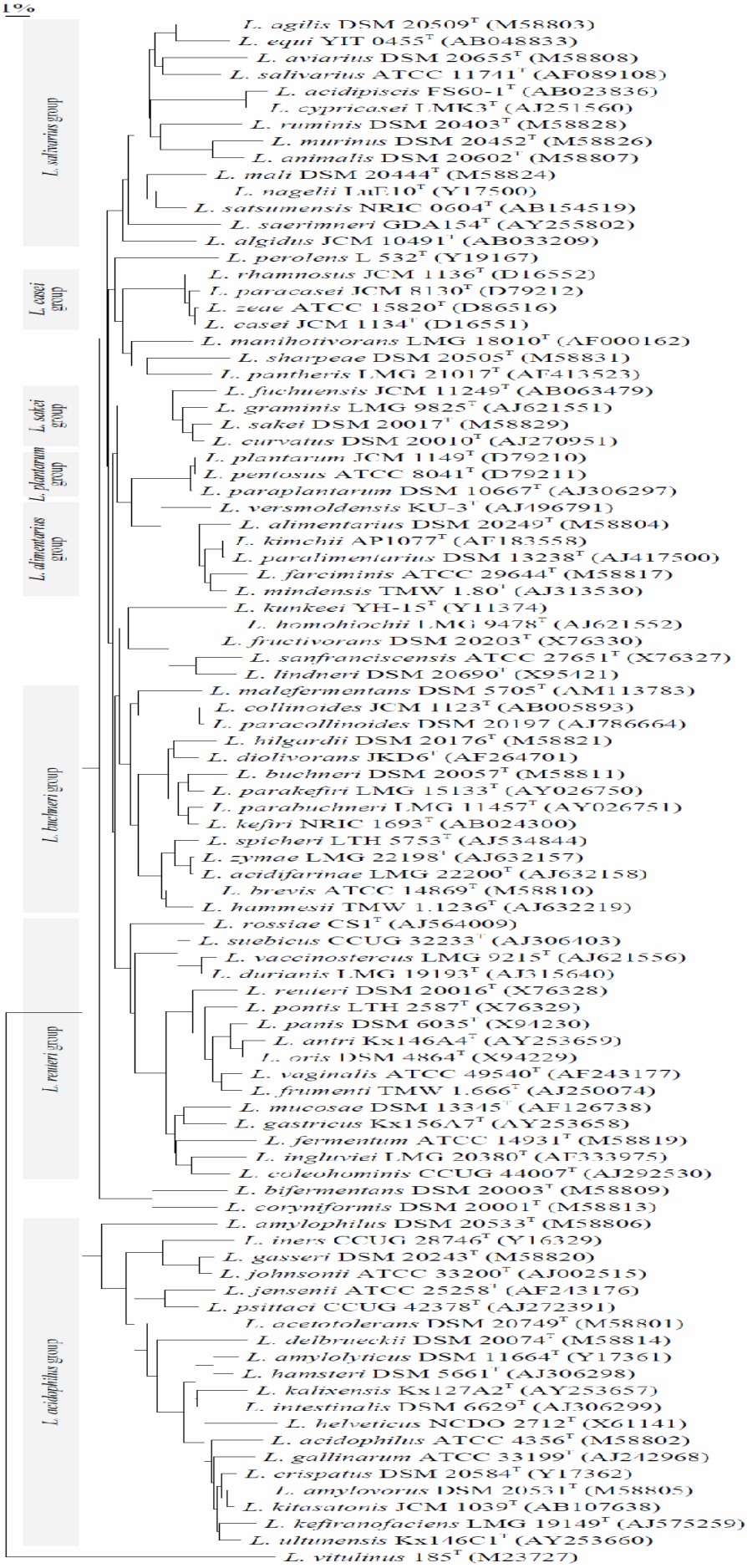
1%
L. salivarius group
L. casei group
L. sakei group
L. plantarum group
L. alimentarius group
L. buchneri group
L. reuteri group
L. acidophilus group
L. agilis DSM 20509T (M58803)
L. equi YIT 0455T (AB048833)
L. aviarius DSM 20655T (M58808)
L. salivarius ATCC 11741T (AF089108)
L. acidipiscis FS60-1T (AB023836)
L. cypricasei LMK3T (AJ251560)
L. ruminis DSM 20403T (M58828)
L. murinus DSM 20452T (M58826)
L. animalis DSM 20602T (M58807)
L. mali DSM 20444T (M58824)
L. nagelii LmE10T (Y17500)
L. satsumensis NRIC 0604T (AB154519)
L. saerimneri GDA154T (AY255802)
L. algidus JCM 10491T (AB033209)
L. perolens L 532T (Y19167)
L. rhamnosus JCM 1136T (D16552)
L. paracasei JCM 8130T (D79212)
L. zeae ATCC 15820T (D86516)
L. casei JCM 1134T (D16551)
L. manihotivorans LMG 18010T (AF000162)
L. sharpeae DSM 20505T (M58831)
L. pantheris LMG 21017T (AF413523)
L. fuchuensis JCM 11249T (AB063479)
L. graminis LMG 9825T (AJ621551)
L. sakei DSM 20017T (M58829)
L. curvatus DSM 20010T (AJ270951)
L. plantarum JCM 1149T (D79210)
L. pentosus ATCC 8041T (D79211)
L. paraplantarum DSM 10667T (AJ306297)
L. versmoldensis KU-3T (AJ496791)
L. alimentarius DSM 20249T (M58804)
L. kimchii AP1077T (AF183558)
L. paralimentarius DSM 13238T (AJ417500)
L. farciminis ATCC 29644T (M58817)
L. mindensis TMW 1.80T (AJ313530)
L. kunkeei YH-15T (Y11374)
L. homohiochii LMG 9478T (AJ621552)
L. fructivorans DSM 20203T (X76330)
L. sanfranciscensis ATCC 27651T (X76327)
L. lindneri DSM 20690T (X95421)
L. malefermentans DSM 5705T (AM113783)
L. collinoides JCM 1123T (AB005893)
L. paracollinoides DSM 20197 (AJ786664)
L. hilgardii DSM 20176T (M58821)
L. diolivorans JKD6T (AF264701)
L. buchneri DSM 20057T (M58811)
L. parakefiri LMG 15133T (AY026750)
L. parabuchneri LMG 11457T (AY026751)
L. kefiri NRIC 1693T (AB024300)
L. spicheri LTH 5753T (AJ534844)
L. zymae LMG 22198T (AJ632157)
L. acidifarinae LMG 22200T (AJ632158)
L. brevis ATCC 14869T (M58810)
L. hammesii TMW 1.1236T (AJ632219)
L. rossiae CS1T (AJ564009)
L. suebicus CCUG 32233T (AJ306403)
L. vaccinostercus LMG 9215T (AJ621556)
L. durianis LMG 19193T (AJ315640)
L. reuteri DSM 20016T (X76328)
L. pontis LTH 2587T (X76329)
L. panis DSM 6035T (X94230)
L. antri Kx146A4T (AY253659)
L. oris DSM 4864T (X94229)
L. vaginalis ATCC 49540T (AF243177)
L. frumenti TMW 1.666T (AJ250074)
L. mucosae DSM 13345T (AF126738)
L. gastricus Kx156A7T (AY253658)
L. fermentum ATCC 14931T (M58819)
L. ingluviei LMG 20380T (AF333975)
L. coleohominis CCUG 44007T (AJ292530)
L. bifermentans DSM 20003T (M58809)
L. coryniformis DSM 20001T (M58813)
L. amylophilus DSM 20533T (M58806)
L. iners CCUG 28746T (Y16329)
L. gasseri DSM 20243T (M58820)
L. johnsonii ATCC 33200T (AJ002515)
L. jensenii ATCC 25258T (AF243176)
L. psittaci CCUG 42378T (AJ272391)
L. acetotolerans DSM 20749T (M58801)
L. delbrueckii DSM 20074T (M58814)
L. amylolyticus DSM 11664T (Y17361)
L. hamsteri DSM 5661T (AJ306298)
L. kalixensis Kx127A2T (AY253657)
L. intestinalis DSM 6629T (AJ306299)
L. helveticus NCDO 2712T (X61141)
L. acidophilus ATCC 4356T (M58802)
L. gallinarum ATCC 33199T (AJ242968)
L. crispatus DSM 20584T (Y17362)
L. amylovorus DSM 20531T (M58805)
L. kitasatonis JCM 1039T (AB107638)
L. kefiranofaciens LMG 19149T (AJ575259)
L. ultunensis Kx146C1T (AY253660)
L. vitulinus 185T (M23727)

Figura 3.3: Árvore neighbour joining construída com seqüências totais do **rRNA 16S** de 201 linhagens tipo de *Lactobacillus*, sendo 98 espécies e 17 subespécies. À esquerda estão indicados os grupos de espécies e entre parênteses, à direita, o número de acesso da seqüência gênica (EMBL) (adaptado de Naser et al., 2007)

3.2 Vibrios patógenos de corais

Em estudo na *Nature Reviews Microbiology*, Rosenberg e colaboradores (2007) resumiram o que se sabe sobre patógenos de corais associados às mais de vinte doenças que incidem sobre estes animais: apenas seis agentes etiológicos foram isolados e caracterizados (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Patógenos de corais (adaptada de Rosenberg et al., 2007)

Doença e localização	Patógeno	Coral hospedeiro	Comentários
Branqueamento no leste do Mediterrâneo	*Vibrio shiloi*[a]	*Oculina patagonica*	Exemplo melhor caracterizado
Branqueamento e lise no Oceano índico e Mar Vermelho	*V. coralliilyticus*	*Pocillopora damicornis*	Branqueamneto ocorre a 23-26 ^{o}C; lise celular a temperaturas >s
Aspergilose no Caribe	*Aspergillus sydowii*	Gorgônias	Fonte dos fungos são tempestades de areia na África e escape da terra
Banda branca no Caribe	*V. chargriae*	*Acropora* spp.	*V. chargriae* é patógeno presuntivo; postulados de Koch não demonstrados
Praga branca no Caribe	*Aurantimonas coralicida*	Vários	*A. coralicida* é o primeiro representante de novo gênero
Praga branca no Mar Vermelho	*Thalassomonas loyand*	Vários	Identidade do patógeno confirmada usando fagoterapia
Pox branca no Caribe	*Serratia marcescens*	*Acropora palmata*	*S. marcescens* é patógeno de humanos e animais domésticos
Banda amarela no Caribe	*V. alginolyticus* (+ 3 *Vibrio* spp.)	*Montastrea* spp.	A sensibilidade à temperatura é semelhante à do branqueamento
Banda negra (amplamente disseminada)	Consórcio	Vários	Bactérias produzem H_2S, que mata os tecidos dos corais

[a] *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 é sinônimo de *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986 (Thompson et al., 2001a)

Em dois casos bem estudados ficou evidente a incidência de branqueamento, ou *coral bleaching*, em decorrência de infecção bacteriana, em situação de elevação da temperatura da água do mar: *Oculina patagonica* e *Vibrio shilloi*; e *Pocillopora*

damicornis e *V. corallilyticus* (BEN-HAIM, ZICHERMAN-KEREN & ROSENBERG, 2003; BEN-HAIM, & ROSENBERG, 2002; KUSHMARO et al.,1997 e 1996). Ritchie e colaboradores (1994) compararam bactérias heterotróficas cultiváveis de *Montastraea annularis* saudáveis e afetadas por branqueamento. Nos animais sadios *Pseudomonas* spp. representavam 13% do total de isolados, embora estivessem ausentes nos doentes. Em contrapartida, espécies de vibrios representavam 30% dos isolados dos corais afetados. Os vibrios estão entre os principais patógenos de corais (ROSENBERG et al., 2007; vide Tabela 3.2) e organismos marinhos, tais como peixes, incluindo tubarões; camarão dentre outros crustáceos, e diversos moluscos (AUSTIN, 2010; VANDENBERGHE et al., 2003).

Em escala global, o branqueamento, cujo sintoma mais óbvio é a perda de cor, tem sido a mais devastadora, dentre outras doenças que afetam corais, como banda preta e banda amarela. Calcula-se que, durante as últimas três décadas, cerca de 30% dos corais foram destruídos em todo o planeta, principalmente em decorrência de doenças emergentes. As previsões alertam que a maior parte dos recifes sobreviverá somente até 2050 (BELLWOOD et al., 2004; HUGHES et al., 2003). Os recifes de corais são ecossistemas dos mais produtivos e de maior biodiversidade, abrigando um quarto de todas as espécies marinhas (KIKUCHI et al., 2003), incluindo comunidades microbianas diversas (ROHWER et al., 2002). O holobionte coral-cérebro *Mussismilia*, endêmico do Brasil, é o principal formador dos recifes brasileiros e apresenta microbiota específica, diferente da de outros organismos marinhos (CHIMETTO et al., 2009 e 2008; REIS et al., 2009). O holobionte compreende o coral, a zooxantela simbionte e a microbiota, que é bastante diversa taxonomicamente (ROSENBERG et al., 2007). Estudos recentes sugerem que as espécies nativas estão sob acelerado processo de extinção (FRANCINI-FILHO et al., 2009).

A opção pelo emprego de vibrios, como modelo na implementação da metodologia de identificação de procariontes por determinação da ΔTm no rtPCR, baseou-se na disponibilidade dos dados de HDD e %GC. No entanto, a aplicação da mesma para identificação de patógenos dos corais *M. hispida e M. braziliensis*, pode contribuir para elucidar aspectos relacionados ao desenvolvimento de doença por estas espécies endêmicas que correm o risco de desaparecer.

Capítulo 4

Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi implementar nova metodologia para identificação e caracterização de procariontes, baseada no uso de plataforma de rtPCR, que possa ser empregada para identificar isolados do processo bioetanol e descrever espécies novas.

4.2 Objetivos específicos

i. Avaliar a diversidade de bactérias presentes no processo produtivo do bioetanol por meio de taxonomia polifásica;

ii. Padronizar o uso de plataforma de rtPCR para determinar ΔTm entre entre DNAs genômicos de linhagens bacterianas de vibrios; e

iii. Padronizar o uso de plataforma de rtPCR para estimar o conteúdo de GC de bactérias com alta e baixa %GC, utilizando DNAs genômicos de espécies de vibrios.

Capítulo 5

Materiais e Métodos

Em março de 2008, no âmbito de uma parceria com o Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (Projeto PROCAD CAPES 2008), foram iniciados estudos com amostras bacterianas isoladas do processo bioetanol, provenientes de três usinas nordestinas. Estas amostras foram selecionadas por serem representativas de grupos previamente reunidos segundo a técnica ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado). A primeira etapa do trabalho consistiu de estudos polifásicos destes isolados para validação, ou não, dos resultados obtidos com ARDRA e avanço na identificação. Durante esta etapa verificou-se a presença de espécies novas a serem descritas. Em alternativa à opção de enviar o material para um centro de referência na Europa para ensaios de HDD, iniciou-se a segunda etapa do trabalho, visando à implementação de nova metodologia de identificação de procariontes, com base na determinação do parâmetro ΔTm, por meio do uso de plataforma de rtPCR, cumprindo também a etapa pré-requisito de determinação da %GC (também em plataforma de rtPCR) (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ, 2005, 2002).

O fluxograma da Figura 5.1 ilustra os dois conjuntos de atividades realizadas em ambas as etapas do trabalho.

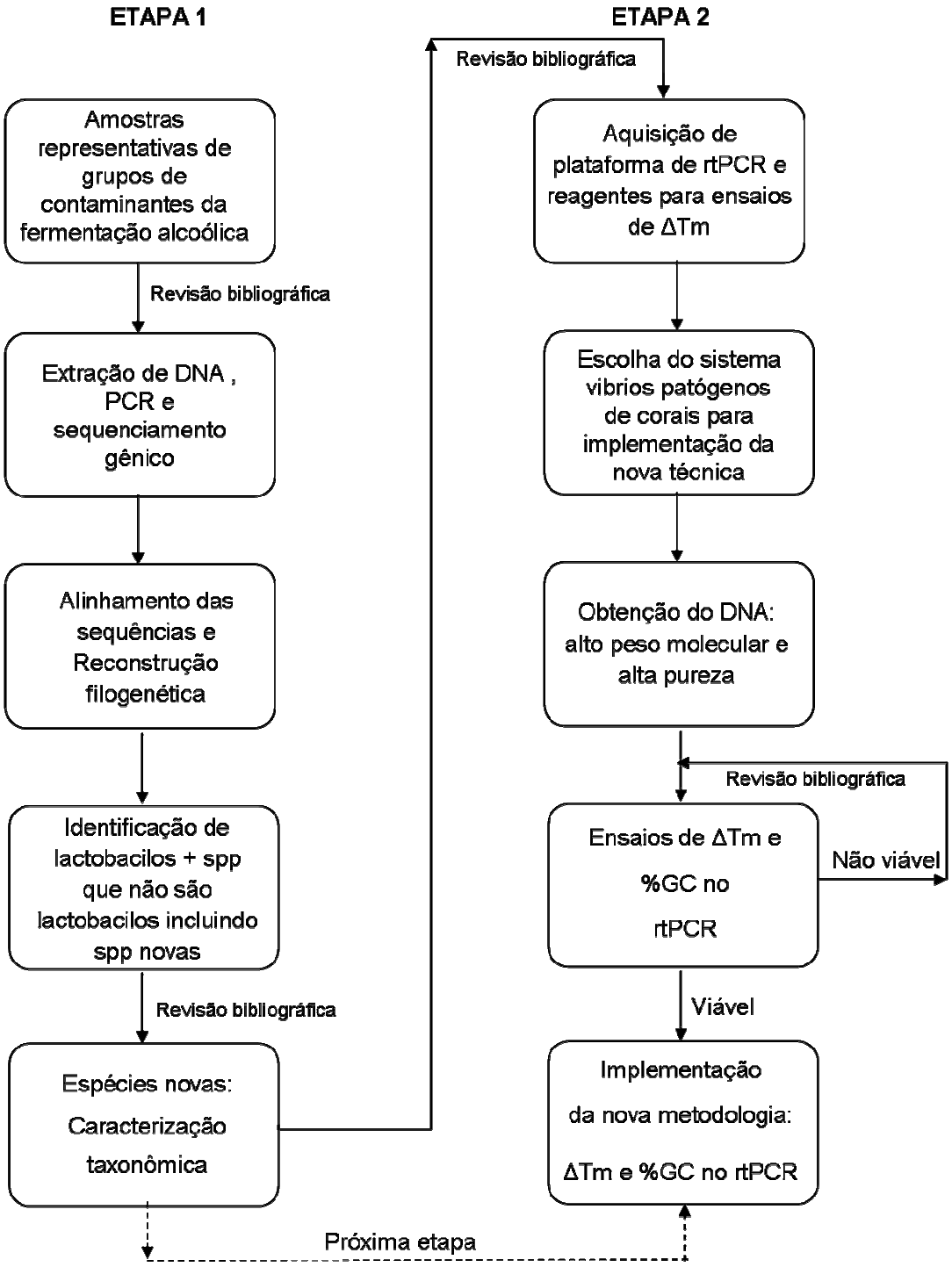

Figura 5.1: Fluxograma indicando os conjuntos de atividades aplicadas nas 2 etapas do trabalho. **ETAPA 1**: taxonomia polifásica; e **ETAPA 2**: implementação da nova metodologia de identificação de procariontes com base no uso de plataforma de rtPCR para determinação da ΔTm e da %GC.

5.1 Etapa 1

5.1.1 Isolados do processo fermentativo da cadeia bioetanol

Foram isolados e agrupados segundo a técnica ARDRA pela doutoranda Brígida Luckwu de Lucena, vinculada ao Laboratório de Genética de Microrganismos (Depto Genética – UFPE), conforme Tabela 5.1:

Tabela 5.1: Isolados do processo bioetanol, de três usinas do Nordeste, reunidos em 4 grupos segundo a técnica ARDRA, e estudados na 1ª etapa do trabalho:

Linhagem	Destilaria Estado	Data Safra 2007/08	Fonte isolamento	Grupos ARDRA
TR7.2.13	Trapiche PE	30 dias	Mosto fermentado	*Lactobacillus* sp. 25
TR7.2.17		30 dias		
TR7.2.19		30 dias		
TR7.2.20		30 dias		
TR7.4.12		90 dias		
TR7.3.10		60 dias		
TR7.3.17		60 dias		
TR7.3.18		60 dias		
TR7.3.19		60 dias		
TR7.1.4	Trapiche PE	1º dia		*Lactobacillus* sp. 21
TR7.1.6		1º dia		
TR7.1.15		1º dia		
TR7.5.7	Trapiche PE	120 dias		*Lactobacillus* sp. 20
TR7.5.13		120 dias		
TR7.5.15		120 dias		
M7.2.18	Miriri - PB	30 dias		BL7
JP7.3.6	Japungu - PB	60 dias		
Total	**17 linhagens**			

A nomeação do grupo BL7 já indicava a presença de linhagens com perfil muito distinto daquelas reunidas nos demais grupos nomeados *Lactobacillus* sp..

5.1.2 Cultivo e preservação dos isolados

Nas etapas 1 e 2, as culturas foram manipuladas sob fluxo laminar em cabine modelo Bio Seg 09 (Veco).

O cultivo foi realizado no meio comercial MRS - *Man*, *Rogosa* e *Sharpe* (Difco), utilizado em caldo e sólido [acrescido de ágar (Merck) a 1,5% (p/v)]. Este meio foi formulado para favorecer o crescimento abundante de lactobacilos. Além de conter fatores de crescimento específicos, como polysorbato 80 que assiste os lactobacilos na captação de nutrientes, contém acetato de sódio que pode suprimir o crescimento de outras bactérias, e apresenta pH aproximado de 6,5; também inibitório para algumas espécies. No entanto, outros *Lactobacillales* podem se desenvolver, como *Leuconostoc, Pedioccocus,* etc. O crescimento foi realizado a 37 ^{o}C, por 48h, em jarras, sob microaerofilia mantida pelo gerador atmosférico Microaerobac (ambos Probac do Brasil). Após o recebimento das amostras, as culturas foram estriadas através da técnica de *spread plate* em placas de Petri para confirmação de que estavam puras. As culturas puras foram preservadas em caldo com glicerol a 20% (v/v) e estocadas à temperatura de -80 ^{o}C (Forma 700 Series – Thermo Scientific).

5.1.3 Extração de DNA

As culturas foram crescidas em placa e as colônias foram coletadas com auxílio de alça bacteriológica. Um volume aproximado de 0,2 mL de *pellet* foi utilizado para a extração de DNA, realizada conforme protocolo descrito por Pitcher e colaboradores (1989).

5.1.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Inicialmente foi realizada a amplificação do gene *phe*S que apresenta melhor poder de resolução que o rRNA 16S para discriminar espécies de lactobacilos, conforme estudo deste gênero segundo a abordagem MLSA (NASER et al., 2007).

Também foi realizado o sequenciamento do gene *phe*S da amostra tipo de *L. vini* (LMG 23202^T). Linhagens desta espécie foram isoladas de uma planta industrial de produção de álcool na qual coexistem em maioria dentre linhagens BAL e a levedura *D. bruxellensis*. Esta levedura é freqüente em usinas nordestinas (PASSOTH, BLOMQVIST & SCHNÜRER, 2007; LIBERAL et al., 2007). Após sequenciamento e reconstrução filogenética (com as seqüências do gene *phe*S) observou-se, dentre os isolados, a presença de espécies que não são lactobacilos e de espécies novas. Estas amostras foram selecionadas para sequenciamento do rRNA 16S completo. As descrições de espécies devem incluir o sequenciamento de fragmento deste gene de tamanho maior que 1300 nucleotídeos (nts) (STAKEBRANDT et al., 2002).

Para amplificação do *phe*S, a PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores, 21F (direto) e 22R ou 23R (reversos) (Tabela 5.2). O 23R foi utilizado somente nos casos em que a amplificação não foi possível com o 22R. Foram gerados fragmentos de aproximadamente 455 pb (NASER et al., 2007, 2005). A reação foi realizada em volume total de 50 μL contendo 25 ng de DNA genômico obtido conforme descrito na Seção 5.1.3, 0,2 mM de cada um dos 4 dNTPs, 1,25 U de GoTaq® DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1X (Invitrogen) com 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,5 μM de cada iniciador. A amplificação do rRNA 16S foi realizada em termociclador MasterCycler Gradient AG modelo 22331 (Eppendorf). O programa térmico consistiu de (1) 104 ºC por 5 min, (2) 3 ciclos de 95 ºC por 1 min; 46 ºC por 2 min 15 s, e 72 ºC por 1 min 15 s, (3) 30 ciclos de 95 ºC por 35 s; 46 ºC por 1 min 15 s, 72 ºC por 1 min 15 s, e (4) 72 ºC por 7 minutos (NASER et al., 2005)

Para amplificação do rRNA 16S, a PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores, 27F e 1492R, desenhados para o anelamento em regiões conservadas nas extremidades do gene e amplamente utilizados, que amplificam um fragmento de aproximadamente 1500 pb (LANE, 1991 apud BOURNE & MUNN, 2005) (Tabela 5.2). A mistura reacional foi realizada conforme descrito para a amplificação do *phe*S e conduzida no mesmo equipamento. O programa térmico consistiu de (1) 95 ºC por 3 min, (2) 30 ciclos de 95 ºC por 1 min; 51 ºC por 1 min 30 s, e 72 ºC por 3 min, e (3) 72 ºC por 30 min.

Em todas as reações (PCR dos genes *phe*S e rRNA 16S) foi incluída uma amostra sem o DNA molde (controle negativo) e outra com DNA molde conhecido e amplificável (controle positivo).

5.1.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos da PCR (5 μl) e o marcador de massa molecular 100 bp DNA ladder (Promega) foram adicionados de 2 μl de tampão de carregamento [0,025 % (v/v) de azul de bromofenol e 50 % de glicerol (v/v)] e aplicados em gel de agarose a 1% (p/v) em TBE 1X com brometo de etídio (0,5 μg/mL). A corrida foi realizada por 40 min a 70 V. Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador sob luz UV (ultravioleta). As imagens foram capturadas e registradas em fotodocumentador Gel Logic 100 (Imaging System) com auxílio do *software* Molecular Imaging (Kodak).

5.1.6 Purificação dos Produtos de PCR

O gene *phe*S está presente em cópia única no genoma de lactobacilos (NASER et al., 2007) e, conforme esperado, foi observada apenas uma banda no gel de corrida dos produtos da PCR. Para as reações positivas, com quantidades e tamanhos desejáveis do produto, a purificação foi feita com o sistema comercial EXOSAP-IT® (USB Corporation), de acordo com as instruções do fabricante.

No gel de separação dos produtos da PCR do gene RNAr 16S foram visualizadas mais de uma banda. A purificação foi realizada a partit do gel de agarose com a utilização do sistema comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). As bandas do tamanho esperado (1,5 kb) foram recortadas e retiradas do gel com o auxílio de uma espátula e a purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

5.1.7 Quantificação do DNA purificado

O DNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (conforme Seção 5.1.5). Os produtos foram quantificados em fotodocumentador Gel Logic 100 (Imaging System) com auxílio do *software* Molecular Imaging (Kodac), por análise comparativa das bandas formadas pelos produtos com as bandas do padrão Low Mass DNA Ladder (Invitrogen), inserido na corrida. De acordo com a necessidade, o produto purificado foi concentrado sob vácuo em SPD 1010 SpeedVac System (Thermo Savant) ou diluído com água MilliQ estéril.

5.1.8 Sequenciamento de DNA

Foram obtidas sequências parciais do gene pheS de todos os isolados com os iniciadores usados na PCR (Tabela 5.2). Após reconstrução filogenética os isolados que não são lactobacilos e aqueles correspondentes a espécies novas foram submetidos ao sequenciamento do rRNA 16S completo, utilizando-se os iniciadores: (i) diretos: 27F, 536F e 926F; e (ii) reversos: 519R, 1093R e 1492R (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Iniciadores utilizados na PCR e sequenciamento:

Iniciador	Sequência (5'→3')[a]	Posição[b]	Referência
pheS -21-F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	557	Naser et al., 2005
pheS-22- R	CCWARVCCRAARGCAAARCC	1031	ibid
pheS-23- R	GGRTGRACCATVCCNGCHCC	968	ibid
16S-27-F	AGAGTTTGATCMTGGCTC	10	Lane, 1991 apud Bourne & Munn, 2005
16S-519-R	GTATTACCGCGGCTGCTG	536	Thompson et al., 2001b
16S-536-F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	519	ibid
16S-1093-R	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1112	ibid
16S-926-F	AACTCAAAGGAATTGACGG	908	ibid
16S-1492-R	GGYTACCTTGTTACGACT	1509	Lane, 1991 apud Bourne & Munn, 2005

[a] Y:C ou T; N: A,C, G ou T; H: A, C ou T; W: A ou T; R: A ou G; V: A, C ou G; M: A ou C
[b] posição de ligação no cromossomo de *E. coli*

O sequenciamento do DNA consistiu da reação de sequenciamento, precipitação da reação de sequenciamento, e corrida no sequenciador automático.

As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate (Applied Biosystems). Cada reação foi realizada em um volume total de 10 µL contendo entre 60 – 80 ng de produto purificado do gene *phe*S ou 80 - 100 ng do RNAr 16S (obtidos conforme descrito nas seções 5.1.3 a 5.1.7); 3,24 pmols de iniciador (Tabela 5.2); 1 µl de ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix, e tampão da reação 0,75X (Big Dye e tampão são reagentes do sistema comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing - Applied Biosystems). Para o controle positivo o DNA e o iniciador usados foram substituídos por 0,5 µl de pGEM 3Zf+, e 2,0 µl de M1 (-21), respectivamente, fornecidos pelo fabricante.

O programa térmico da reação de sequenciamento consistiu de 25 ciclos de (1) 96 ^{o}C por 10 s, (2) 50 ^{o}C por 5 s, e (3) 60 ^{o}C por 4 min. A reação foi conduzida no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (9700) (Applied Biosystems).

Os produtos gerados em cada um dos poços da placa foram incubados por 15 min em 80 µl de isopropanol a 75% (v/v), à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas por 45 min, a 3.250 x g, a 21 ºC (Centrífuga 5810R - Eppendorf) para precipitação. Os sobrenadantes foram descartados pela inversão das placas sobre papel toalha e as placas (invertidas sobre papel toalha) foram centrifugadas por 1 min, a 165 x g, a 21 ºC, para remoção do sobrenadante residual. Em seguida foram incubadas a 75 ºC por 5 min no 9700, para secagem do material.

A desnaturação foi realizada com 10 µl de formamida e a placa foi centrifugada por 1 min, a 165 x g, a 21 ºC, sendo submetida a um ciclo de secagem a 95 ^{o}C por 5 min no 9700. Em seguida a placa foi submetida a choque térmico, tendo sido colocada sobre gelo e prontamente conduzida para o sequenciador automático. A separação dos fragmentos de DNA foi realizada com o ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O tempo e a voltagem utilizados na

injeção da amostra foram de 10 s e 1.6 kV, respectivamente. Cada corrida foi realizada a 60 ^{o}C por 2.800 s a 5 µAmps e 13,4 kV.

5.1.9 Reconstrução filogenética

Foram geradas sequências-consenso parciais do *phe*S e totais do RNAr 16S, contendo aproximadamente 455 pb e 1500pb, respectivamente, a fim de posicionar as amostras no espaço filogenético. Estas seqüências foram comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados e, juntamente com as seqüências das linhagens tipo mais similares, foram empregadas para a construção de árvores filogenéticas.

As sequências-consenso foram obtidas através da sobreposição das sequências advindas de cada iniciador (direto e reverso), com o auxílio da ferramenta Genebuilder, embutida no pacote do programa Kodon versão 3.0. A edição das sequências foi realizada com base na observação da intensidade do sinal do cromatograma e da correspondência entre as fitas paralela e antiparalela do DNA sequenciado. As extremidades das sequências foram descartadas, pois nestas regiões a qualidade do sinal é insuficiente para determinação da composição de bases com confiança.

As sequências-consenso geradas foram revertidas para o formato Fasta e comparadas com seqüências depositadas no banco de dados público mundial GenBank (GENBANK, 2009) através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tools* - BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) e/ou do SEQ Match do *Ribossomal Database Project* - RDP (COLE et al., 2007). O número de acesso das linhagens tipo mais similares aos isolados foi obtido com base na lista de nomes validados publicada em *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* - LPSN (EUZÈBY, 2008). As sequências das linhagens tipo mais similares e com nomes válidos foram capturadas diretamente do *National Center for Biotechnology* Information - NCBI (NCBI, 2009), para fins de comparação.

O alinhamento das sequências foi realizado com o Clustal W (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1994). A árvore filogenética e a matriz de similaridade foram geradas com o auxílio do programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), com a opção de deleção completa. O modelo de reconstrução das árvores filogenéticas utilizado foi o *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987). As árvores foram construídas com base em uma matriz de similaridade calculada através da distância-p (análise par a par). A topologia da árvore filogenética não enraizada resultante foi analisada com um valor de *bootstrap* baseado em 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985).

5.1.10 Caracterização fenotípica

Foi realizada por meio do sistema comercial miniaturizado GP2 MicroPlate (Biolog), para bactérias Gram-positivas, incluindo 95 testes bioquímicos (Fig. 5.2). As culturas foram estriadas 2x antes da confecção do inóculo [células em solução salina a 0,85% (p/v)]. Cada poço das microplacas foi inoculado com 150 µl da suspensão bacteriana com a densidade ótica (OD) - medida a 595 nm - recomendada pelo fabricante e correspondente a 65% de transmitância. A medida da OD foi realizada em espectrofotômetro digital Biophotometer plus (Eppendorf), após incubação sob microaerofilia (Seção 5.1.2), por 24h a 30 ^{o}C, em Termo Shaker Modelo 2502 (Fanem) (De ANGELIS et al., 2007). Também foi avaliada a resistência a diferentes tensões de oxigênio. Além do crescimento sob microaerofilia as culturas foram crescidas em placas sob aerobiose e anaerobiose, nesse caso mantida pelo gerador atmosférico Anaerobac, em jarras (ambos Probac do Brasil).

A1 Água	B1 L-arabinose	C1 α-D-Lactose	D1 β-Metil-D-Glucosídeo	E1 D-Tagatose	F1 Lactamida	G1 L-Alalinamida	H1 Adenosina
A2 α-Ciclodextrina	B2 D-arabitol	C2 Lactulose	D2 α-Metil-D-Manosídeo	E2 D-Trealose	F2 Ácido Metil Éster D-Acético	G2 D-Alanina	H2 2`-Deoxiadenosina
A3 β-Ciclodextrina	B3 Arbutina	C3 Maltose	D3 Palatinose	E3 Turanose	F3 Ácido L-Lático	G3 L-Alanina	H3 Inosina
A4 Dextrina	B4 D-celobiose	C4 Maltotriose	D4 D-Psicose	E4 Xilitol	F4 Ácido D-Málico	G4 L-Alanil-Glicina	H4 Timidina
A5 Glicogênio	B5 D-Frutose	C5 D-Manitol	D5 D-Rafinose	E5 D-Xilose	F5 Ácido L-Málico	G5 L-Asparagina	H5 Uridina
A6 Inulina	B6 L-Frutose	C6 D-Manose	D6 L-Ramnose	E6 Ácido Acético	F6 Ácido Metil Éster Piruvático	G6 Ácido L-Glutâmico	H6 5`-Monofosfato de Adenosina
A7 Manana	B7 D-galactose	C7 D-Melezitose	D7 D-Ribose	E7 Ácido α-Hidroxibutírico	F7 Ácido Mono Metil Éster Succínico	G7 Ácido Glicil-L-Glutâmico	H7 5`-Monofosfato de Timidina
A8 Tween 40	B8 Ácido D-Galacturônico	C8 D-Melibiose	D8 Salicina	E8 Ácido β-Hidroxibutírico	F8 Ácido Propiônico	G8 ÁcidoL-Piroglutâmico	H8 5`-Monofosfato de Uridina
A9 Tween 80	B9 Gentiobiose	C9 α-Metil-D-Galactosídeo	D9 Sedoheptulosana	E9 Ácido γ-Hidroxibutírico	F9 Ácido Pirúvico	G9 L-Serina	H9 D-Frutose 6-fosfato
A10 N-Acetil-D-Glicosamina	B10 Ácido-D-Glucônico	C10 β-Metil-D-Galactosídeo	D10 D-Sorbitol	E10 Ácido p-Hidroxi-Fenilacético	F10 Ácido Succinâmico	G10 Putrescina	H10 α-D-Frutose 1-fosfato
A11 N-Acetil-β-D-Manosamina	B11 α-D-gGlucose	C11 3-Metil-Glucose	D11 Stachiose	E11 Ácido α-Cetoglutárico	F11 Ácido Succínico	G11 2,3-Butanodiol	H11 D-Glucose 6-fosfato
A12 Amigdalina	B12 m-Inositol	C12 α-Metil-D-Glucosídeo	D12 Sacarose	E12 Ácido α-Cetovalérico	F12 Ácido N-Acetil-L-Glutâmico	G12 Glicerol	H12 D-L-α-Glicerol Fosfato

Figura 5.2: Fontes de carbono e mapa da GP2 MicroPlate (Biolog)

5.2 Etapa 2

Cultivo e preservação das amostras tipo de vibrios patógenos de corais

As linhagens de vibrios patógenos de corais utlizadas estão relacionadas na Tabela 5.3.

O cultivo das bactérias foi realizado em meio comercial TSB (Tryptic Soy Broth - Bacto), utilizado em caldo e sólido [acrescido de ágar (Merck) a 1,5% (p/v)]; e em ambos os casos adicionado de NaCl [concentração final 2,5% (p/v)]. Em alguns casos foi usado o meio comercial Marine (Difco), também utilizado em caldo e sólido [acrescido de ágar (Merck) a 1,5% (p/v)]. Ambos são meios ricos, cuja concentração salina é indispensável ao crescimento de bactérias marinhas, porém suficiente para inibir muitas outras.

O crescimento foi realizado a 28°C em incubadora B.O.D. mini CT-703 (Cientec), por 24h. A preservação foi realizada no meio usado para cultivo, conforme descrito na Seção 5.1.2.

Extração do DNA genômico

Foi realizada conforme protocolo descrito por Pitcher e colaboradores (1989), com modificações visando à obtenção de DNA de alta massa molecular e elevada pureza, em grande quantidade. As principais alterações foram: (i) a massa celular inicial significativamente maior, e consequentemente o volume de todos os reagentes empregados no processo; (ii) a realização de duas extrações com clorofórmio-álcool isoamílico, de modo a livrar os ácidos nucléicos de material protéico com eficácia, e (iii) a separação do DNA precipitado do meio reacional, com bastão de vidro, ao invés da tradicional centrifugação e descarte do sobrenadante.

O processo foi realizado em 2 etapas principais, cada uma delas incluindo uma extração com clorofórmio-álcool isoamílico.

Na primeira etapa as culturas foram crescidas em meio sólido do qual foi coletado cerca de 1g de células com alça bacteriológica. O *pellet* de cada amostra foi lavado em 3 mL de tampão de ressuspensão com NaCl a 3% (p/v) e novamente ressuspendido em 15 mL de TE 1X pH 8,0 com NaCl a 3% (p/v) em tubo de polipropileno com capacidade para 50 mL (Nalgene). Foram adicionados 15 mL de solução GES [tiocianato de guanidina, EDTA e N-lauril-sarcosina (PITCHER et al., 1989)] e a mistura foi mantida no gelo por 15 min. Em seguida foram adicionados 8 mL de NH_4Ac a 7,5 M e novamente a mistura foi mantida no gelo por 15 min. Então foram adicionados 10 mL de clorofórmio-álcool isoamílico [24:1 (v/v) (ambos Merck)] e as fases foram misturadas vigorosamente até a formação de emulsão. Os tubos foram centrifugados a 17.000 x g em centrífuga modelo J2-21, rotor JA-10 (Beckman) por cerca de 40 min ou mais, até que a fase superior estivesse transparente (células lisadas). A fase superior (24 a 27 mL) de cada tubo foi transferida com pipeta descartável para um *becker* de 100 mL contendo 0,54 volumes (12 a 15 mL) de isopropanol (Merck) gelado. Foram realizados movimentos circulares com um bastão de vidro para precipitar e enrolar o DNA, até que o mesmo pudesse ser removido do *becker*. O DNA foi brevemente mantido à temperatura ambiente para evaporação do álcool e lavado 2x com EtOH a 70 % (v/v) e 1x com EtOH absoluto (Merck), por inversão do bastão de vidro em tubos de 12 mL (falcon) contendo as soluções de lavagem. O DNA foi novamente mantido à temperatura ambiente até que ficasse transparente (seco). Em seguida o bastão com o DNA foi invertido num tubo de 12 mL (falcon) contendo 5 mL de TE 1X pH 8,0. A extremidade superior do tubo foi vedada com parafilme e o material foi mantido a 4^oC *overnight* (ON) ou até que estivesse completamente dissolvido.

Na segunda etapa o bastão de vidro foi removido cuidadosamente e a solução foi incubada com RNase (Ribonuclease A Tipo I-A – Sigma) a 20 µg/mL por 1 h a 37 ºC. Após a incubação foram adicionados 625 uL de acetato-EDTA (pH 7,0) e a mistura foi cuidadosamente invertida. Foram adicionados 5 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (mesma proporção usada na primeira etapa) e as fases foram misturadas vigorosamente até a formação de emulsão. Em seguida foram repetidos os procedimentos posteriores à adição de clorofórmio-álcool isoamílico realizados na primeira etapa da extração, sendo respeitadas as proporções volumétricas, e com a

diferença de que o DNA foi dissolvido em 0,5 mL de SSC 0,1X (pH 7,0), em eppendorf de 2mL, também a 4 ^{o}C ON, ou até que estivesse completamente dissolvido. O DNA genômico obtido foi preservado a -80 ^{o}C.

Avaliação da qualidade e quantificação do DNA genômico

A qualidade do DNA foi avaliada quanto à integridade e pureza.

A integridade foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose conforme descrito na Seção 5.1.5. Foram consideradas íntegras as amostras cujas bandas ficaram definidas no gel, sem rastros, indicando a presença de DNA de alta massa molecular.

Além da massa molecular, a quantidade e a pureza foram avaliadas espectrofotometricamente, pelas medidas A_{230}, A_{260}, e A_{280}, em espectrofotômetro digital (Seção 5.1.10). A concentração foi estimada a partir da medida A_{260}. Quanto à pureza, foram considerados viáveis para os experimentos de ΔTm e %GC, DNAs íntegros e com valores de (i): A_{260}:A_{280} entre 1,8 e 2,0; e (ii) A_{260}: A_{230} > 2,0.

Apesar de nts apresentarem absorbância máxima a 260 nm, outras substâncias, principalmente proteínas, também absorvem luz neste comprimento de onda. No entanto, proteínas e demais contaminantes apresentam A_{max} em outros comprimentos de onda. Proteínas apresentam A_{max} = A_{280} e para compostos orgânicos, tiocianatos e fenolatos, A_{max} = A_{230} (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

ΔTm em plataforma de rt PCR

A plataforma selecionada e adquirida para o desenvolvimento do trabalho foi o modelo ABI 7500 (Applied Biosystems) (Fig. 5.3). Este equipamento é compacto, robusto, capaz de uma rampa térmica de +/-1,6 ℃/s na faixa de 4 a 100 ℃, com acurácia de +/-0,25℃ (entre 35 e 95 ℃). O sistema ótico é constituído de uma câmera CCD (*charge coupled device*), uma lâmpada de excitação de halogênio e 5

filtros (de emissão e captação) permitindo a utilização de múltiplos fluoróforos (SYBR® Green I, FAM™, VIC™, JOE™, NED™, TAMRA™, ROX™, Texas Red®, Cy3™, Cy5™). O espectro de fluoróforos pode ser ampliado pela calibração do equipamento (*custom dye calibration*). O programa para operação da máquina é amistoso e a assistência técnica no Brasil pode ser considerada das melhores se comparada aos concorrentes, incluindo o treinamento dos usuários e sistema 0800 de suporte técnico.

Figura 5.3: Plataforma de rtPCR modelo ABI 7500. À esquerda está representado o modo de interface com o equipamento através do 7500 Software v.2.0.1(Applied Biosystems).

O protocolo foi realizado segundo Gonzalez & Saiz-Jimenez (2005)*, em três etapas:

Na primeira etapa o DNA foi hibridizado em placas de 96 poços ABI Prism Optical Reaction Plates (Applied Biosystems), em volume total de 25 µL, em SSC 0,1X, cobertas com adesivo ótico MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). Inicialmente uma solução equimolar de DNAs de linhagens relacionadas (obtidos conforme descrito na Seção 5.2.2), contendo 5 µg de DNA, foi incubada à T_{OR} (equação 1) por 8h, após 10 minutos de desnaturação à 99 ^{o}C. O resfriamento foi conduzido lentamente, em degraus de 1h de duração cada, à T_{OR} – 10 ^{o}C, T_{OR} – 20 ^{o}C, e assim sucessivamente, até a temperatura de 25 ^{o}C. Ao final da escada térmica a temperatura foi mantida em 4 ^{o}C até a etapa seguinte. O programa térmico foi conduzido no 9700.

* Trabalho realizado em modelo iCycler (Biorad)

Na segunda etapa o fluoróforo SYBR (Invitrogen) foi adicionado (concentração final 1:100.000X), elevando o volume total de cada poço para 30 µL. Esse procedimento foi realizado ao abrigo da luz e as placas foram novamente cobertas com adesivo ótico. Em seguida foi realizada a desnaturação térmica na plataforma de rtPCR à 0,2 ^{o}C/s (1 ^{o}C/min), com medida da fluorescência a cada intervalo, por 12 s, durante toda a rampa de desnaturação, conduzida entre 25 e 99,8 ^{o}C (Fig. 5.4). Desse modo, foram obtidas 375 medidas de fluorescência, a cada 0,2 ^{o}C entre 25 e 99,8 ^{o}C, fornecidas em unidades arbitrárias de fluorescência, de acordo com a calibração do sistema ótico do equipamento e com as medidas obtidas para os controles negativos, pelo 7500 Software v.2.0.1 (Applied Biosystems).

Os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo poços sem DNA, como controle negativo e da fluorescência de base (*background*).

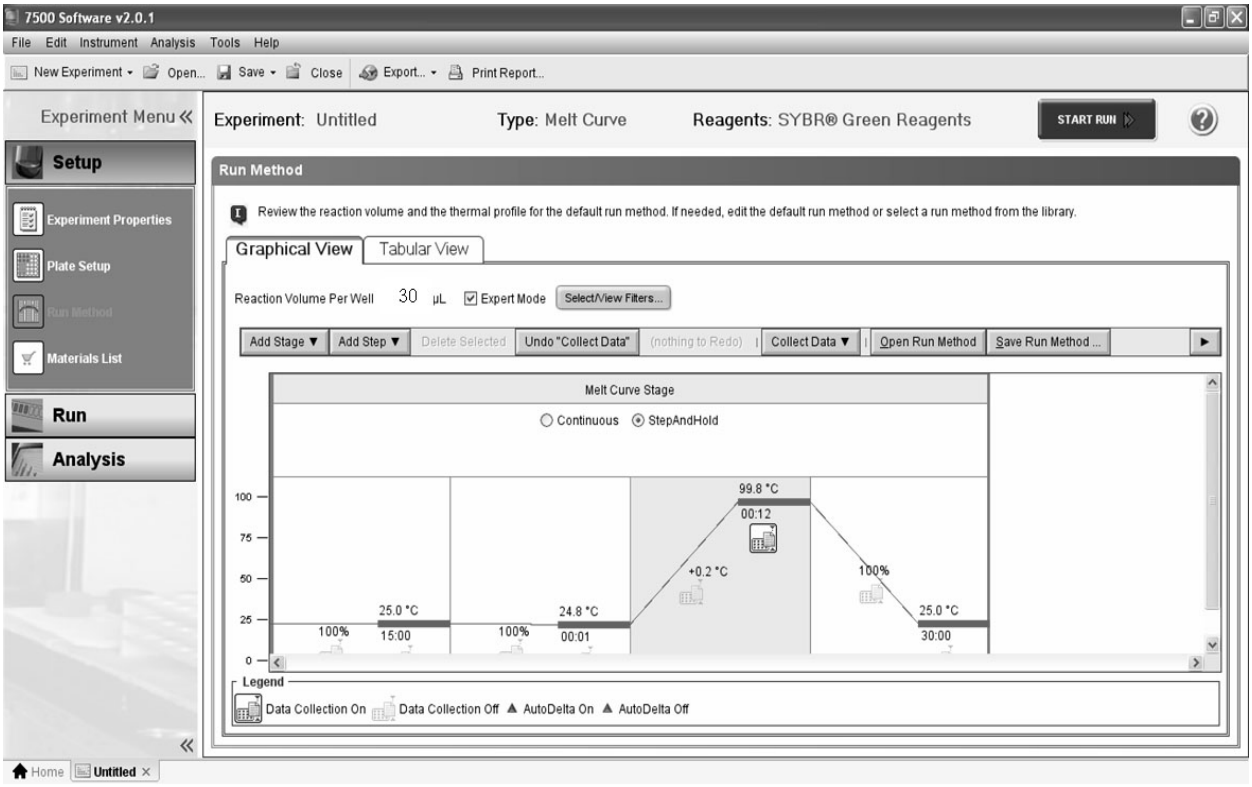

Figura 5.4: Método da corrida visualizado na interface do equipamento: 7500 *Software* v.2.0.1 (Applied Biosystems).

Na terceira etapa foram obtidas as Tms do DNA híbrido e do DNA de referência (homólogo), correspondentes à temperatura da curva de desnaturação

onde foi observada uma redução de 50% da fluorescência inicial. Foi considerada a média aritmética dos resultados das triplicatas de cada amostra. A ΔTm, entre o híbrido e o homólogo, foi obtida pelo cálculo da diferença entre as respectivas Tms.

Os dados de ΔTm obtidos foram comparados ao grau de similaridade entre os genomas segundo a técnica padrão de HDD (%), de acordo com os dados disponíveis na literatura, de modo que os resultados obtidos fossem validados pelos resultados pretéritos gerados pelo método padrão.

Foram utilizados 19 pares de linhagens de vibrios patógenos de corais com valores de HDD entre 99 e 22%, distribuídos de modo relativamente equivalente nas três faixas de porcentagem de similaridade (quanto à HDD): 20 – 50; 51 – 80, e 81 – 100 (Tabela 5.3).

Foi gerada uma equação correlacionando os resultdos de ΔTm (^{o}C) e HDD (%) de acordo com a literatura, de modo que a metodologia de ΔTm, no sistema estabelecido, possa ser empregada para a identificação de procariontes e descrição de espécies novas.

%GC em plataforma de rt PCR

Foi estimada segundo Gonzalez & Saiz-Jimenez (2002)* tendo sido usados equipamento e fluoróforo descritos na Seção. 5.2.4.

Foram utilizadas as mesmas placas usadas nos experimentos de ΔTm, cobertas com o adesivo ótico apropriado (Seção. 5.2.4), previamente ao ensaio. Inicialmente, cada poço foi preenchido com volume total de 25 µL contendo 2 µg de DNA em SSC 0,1X com SYBR a 1:100.000X.. Após selada, a placa contendo os DNAs em tampão citrato com SYBR foi inserida na plataforma de rtPCR. Em seguida foi realizada a desnaturação térmica à 0,2 ^{o}C/s (1 ^{o}C/min), com medida da fluorescência a cada intervalo, por 12 s, durante toda a rampa de desnaturação,

* Trabalho realizado em modelo iCycler (Biorad)

conduzida entre 25 e 99,8 ^{o}C (método da corrida conforme Seção. 5.2.4 e Fig 5.4). Os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo poços sem DNA, como controle negativo e da fluorescência de base (*background*). A Tm foi obtida com auxílio do do programa 7500 Software v.2.0.1.

Conforme definido no capítulo 2, a Tm é o ponto médio da curva de desnaturação térmica do DNA em tampão citrato, que apresenta perfil característico quanto à A_{260}. A Tm pode ser obtida graficamente, como o ponto de inflexão entre as assíntotas inferior e superior da curva de desnaturação térmica (Fig 5.5, gráfico acima), ou como a derivada máxima desta curva (RITZ et al.,1997). O mesmo princípio foi aplicado para obtenção da Tm a partir da curva de desnaturação térmica em presença de SYBR, gerada na plataforma de rtPCR. Neste caso, também conforme descrito no Capítulo 2, a fluorescência/sinal é máxima no início da desnaturação e mínima ao final. As alterações na fluorescência durante a desnaturação térmica do DNA, determinam uma curva com o mesmo perfil da curva determinada pelas alterações na absorbância, porém invertida (Fig 5.5, gráfico abaixo).

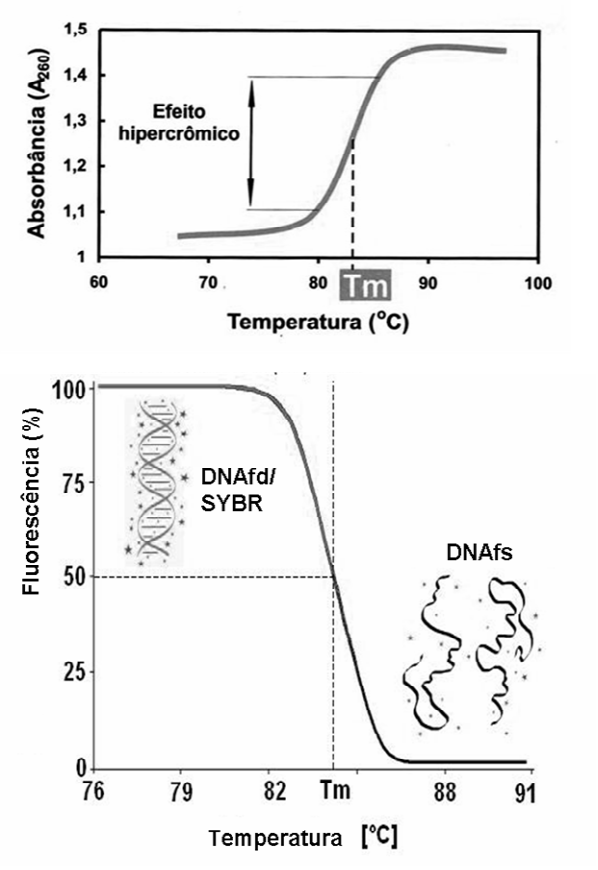

Figura 5.5: ACIMA: Curva característica da **absorbância** a 260 nm (A_{260}) durante a desnaturação témica de solução de DNA em tampão citrato: a Tm é o ponto médio da desnaturação, graficamente é o ponto de inflexão entre as assíntotas inferior e superior. **ABAIXO**: Curva característica da **fluorescência** (%) durante a desnaturação témica de solução de DNA, em presença de SYBR GREEN I, em tampão citrato: a Tm é o ponto médio da desnaturação, graficamente é o ponto de inflexão entre as assíntotas inferior e superior (adaptado de Zaha, Ferreira & Passaglia, 2003).

Portanto, primeiramente foi gerada a curva correspondente à primeira derivada, nesse caso negativa, da curva de desnaturação, com auxílio do programa 7500 Software v.2.0.1:

$$-dF/dT \quad (6)$$

Onde: dF = derivada da fuorescência, e dT = derivada do tempo

Foi considerada Tm o ponto máximo desta curva, gerada segundo a equação 6, valor obtido com auxílio do programa 7500 Software v.2.0.1. Foi considerada a média aritmética dos resultados das triplicatas de cada amostra.

A Tm obtida para cada linhagem foi correlacionada à sua %GC, de acordo com os dados da literatura. Foi construída uma curva padrão Tm (^{o}C) x GC (%), incluindo 9 linhagens de vibrios patógenos de corais com conteúdo de GC variando de 41 a 50 % (Tabela 5.3). A curva gerada foi comparada à uma curva construída com os valores experimentais obtidos pelos autores do método, com linhagens com conteúdo de GC na mesma faixa dos vibrios estudados (GONZALEZ & SAIZ-JIMENEZ, 2002).

Tabela 5.3: Linhagens de vibrios patógenos de corais utilizadas nos ensaios de ΔTm e % GC

Espécies de *Vibrio* (DNA)	GC (%)	Referência	Pares de espécies de *Vibrio* (DNA)	HDD (%)	Referência
V. cyclitrophicus LMG 21359T	41,5	Thompson et al., 2003b; Hedlund & Staley, 2001	*V.cholerae* LMG 21698T - *V.cholerae* ElTor R-18308	81 -100	Thompson et al., 2003c
V. hispanicus - LMG 13240T	42,8	Gomez-Gil et al., 2004b	*V. coralliilyticus* LMG 20984T - *V. coralliilyticus* LMG10953		Bem-Haim et al., 2003
V. halioticoli - LMG 18542T	43,1	Saw abe et al., 1998	*V.cholerae* LMG 21698T - *V.cholerae* Amazon R-18337		Thompson et al., 2003c
V. orientalis - LMG 7897T	44,4	Thompson et al., 2003b	*V. coralliilyticus* LMG 21349 - *V. coralliilyticus* LMG 10953		Ben-Haim et al., 2003
V. chagasii - R-3712T	44,6	ibid	*V. coralliilyticus* LMG 20984T - *V. coralliilyticus* LMG21349		ibid
V. kanaloae - INCO 191T	44,7	ibid	*V.cholerae* LMG 21698T - *V.mimicus* LMG 7896T	51 - 80	Thompson et al., 2003c
V. brasiliensis - INCO 317T	45,9	Thompson et al., 2003a	*V.harveyi* LMG 4044T - *V.harveyi* LMG 20370		Thompson, 2003
V. xuii - LMG 21346T	46,6	ibid	*V.harveyi* LMG 4044T - *V. campbellii* LMG 11216T		Gomez-Gil et al., 2004a
V. furnissii - LMG 7910T	50,4	Brenner et al.,1983	*V. coralliilyticus* LMG 20984T - *V. neptunius* RFT5		Thompson et al., 2003a
Sub-total: 9 linhagens			*V. coralliilyticus* LMG 20984T - *V. neptunius* CAIM 536T		ibid
			V.harveyi LMG 4044T - V. campbellii R-14899		Gomez-Gil et al., 2004a
			V.splendidus LMG 19031T - *V. chagasii* R-3712T		Thompson et al., 2003b
			V.harveyi LMG 4044T - *V. alginolyticus* LMG 4409T	20 - 50	Thompson, 2003
			V.*harveyi* LMG 4044T - *V. natriegens* LMG 10935T		Thompson, 2003
			V. coralliilyticus LMG10953 - *V. nereis* LMG 3895T		Ben-Haim et al., 2003
			V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. nereis* LMG 3895 T		Thompson et al., 2003a
			V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. brasiliensis* LMG20010		ibid
			V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. xuii* STD3-1204		ibid
			V. orientalis LMG 7897T - *V. mytili* LMG19157T		Thompson et al., 2003d
			Sub-total: 22 linhagens (19 pares)		
Total: 31 linhagens					

OBS.: [1]Nos itens com duas referências, foi considerada a média aritmética [GC (%) ou HDD (%)] dos valores obtidos pelos autores citados
[2]Nos ensaios de HDD também foram utilizadas linhagens de vibrios patógenos humanos (*V. cholerae*/*mimicus*)

Capítulo 6

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nas duas etapas do trabalho foram referentes à taxonomia polifásica de linhagens BAL isoladas do processo bioetanol, e ao estabelecimento de nova metodologia de identificação de procariontes por meio da determinação da ΔTm e %GC em plataforma de rtPCR.

Etapa 1: Taxonomia polifásica

6.1.1 Identificação de amostras LAB isoladas do processo bioetanol

Inicialmente foi utilizado o gene *phe*S para a identificação dos isolados. Na maioria dos casos, este gene permite discriminar mais de 10% de divergência entre espécies de lactobacilos, apresentando melhor poder discriminatório não só do que o gene RNAr16S, mas também que o *rpo*A, conforme resultados de estudos realizados com lactobacilos segundo MLSA (NASER et al., 2007).

A árvore filogenética resultante do alinhamento das seqüências do gene *phe*S encontra-se representada na figura 6.1. Os isolados estão distribuídos em três gêneros de bactérias láticas e não apenas dentro do gênero *Lactobacillus*. Os dois outros gêneros pertencem à família *Lactobacillaceae* e são *Weissella* e *Oenococcus*.

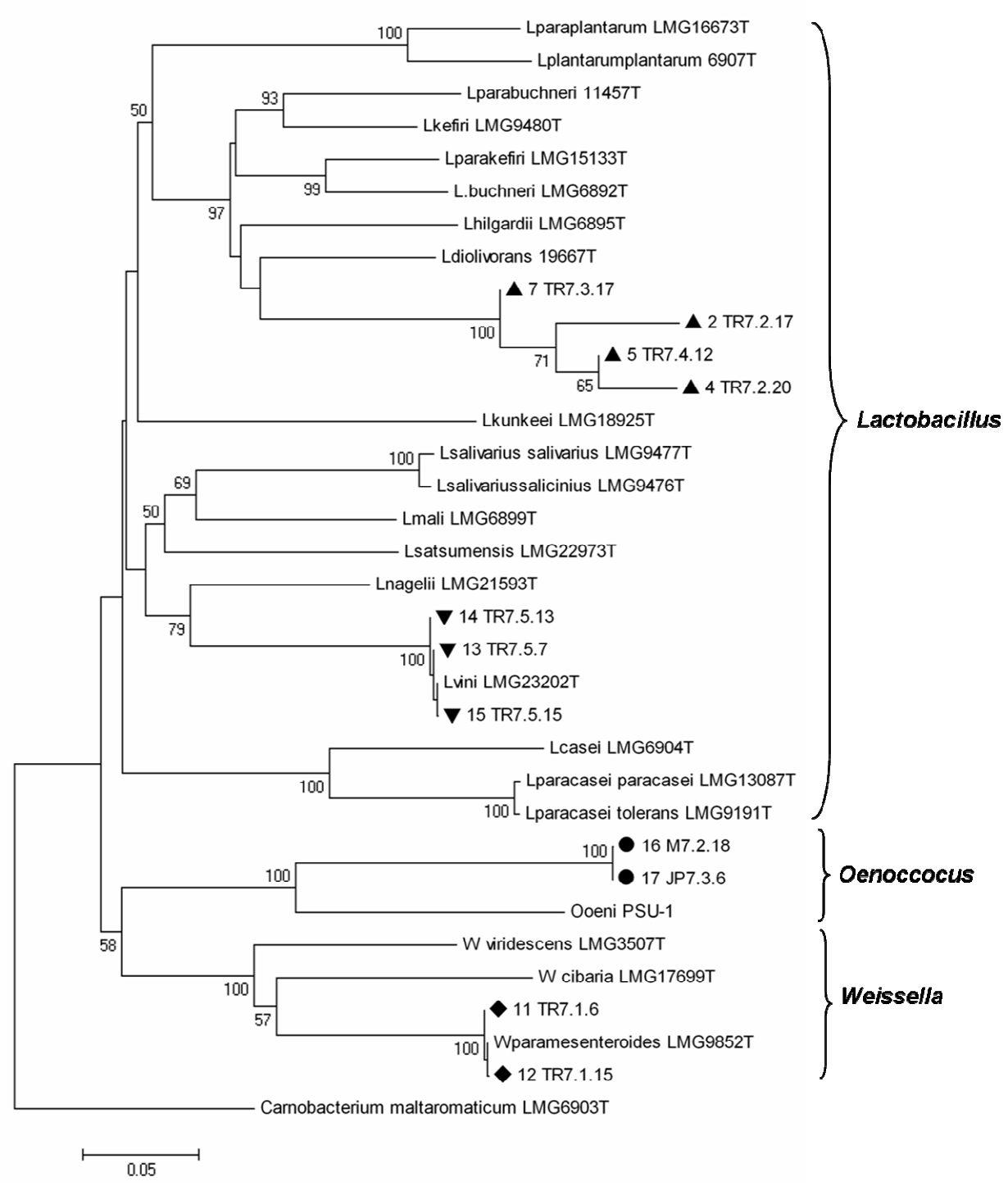

Figura 6.1: Árvore *Neighbor-Joining* representativa dos gêneros *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Weissella,* baseada em sequências parciais do gene ***phe*S** de linhagens tipo e de isolados do processo fermentativo bioetanol. A significância está representada pelo valor de *bootstrap* (%) calculado com base em 1000 réplicas. Apenas valores acima de 50% estão representados. A barra de escala representa 5% de diferença. A nomenclatura dos isolados foi estabelecida de acordo com a identificação prévia realizada com a técnica ARDRA. **TRIÂNGULO**: *Lactobacillus* sp. 25; **TRIÂNGULO INVERTIDO**: *Lactobacillus* sp. 20; **CÍRCULO**: BL7,e **LOSANGO**: *Lactobacillus* sp. 21. *Carnobacterium maltaromaticum* foi incluída como *outgroup*.

Há vários relatos da presença de *Leuconostoc* (SKINNER-NEMEC, NICHOLS & LEATHERS, 2007; AMORIM, 2005; SKINNER & LEATHERS, 2004; OLIVA-NETO & YOKOYA, 1998), e alguns de *Weissella* (PASSOTH, BLOMQVIST & SCHNÜRER, 2007; SKINNER & LEATHERS, 2004) no processo bioetanol. Porém *Oenococcus* não havia sido previamente detectado.

A presente classificação dos gêneros *Leuconostoc*, *Weissella* e *Oenococcus* resulta da reclassificação de *Leuconostoc paramesenteroides* e alguns lactobacilos heterofermentativos atípicos, como *Weissella* (COLLINS et al., 1993), e de *Leuconostoc oenos* como Oenococcus oeni (DICKS, DELLAGLIO & COLLINS, 1995). Linhagens de *O. oeni,* naturalmente presentes em fermentações de frutas e habitats relacionados, são frequentemente isoladas de fermentações alcoólicas para produção de vinho e empregadas nas vinícolas para conduzirem a conversão malolática, importante fermentação secundária no processo produtivo do vinho. A linhagem *O. oeni* PSU-1, cujo genoma foi sequenciado pelo DOE *Joint Genome Institute* (JGI) é utilizada comercialmente com esta finalidade. Dentre as BAL, esta espécie é a mais resistente à acidez e ao álcool, caraterísticas desejáveis em processos industriais (CHELO, ZÉ-ZÉ & TENREIRO, 2007).

Os 4 grupos de isolados definidos com a técnica ARDRA corresponderam a 2 grupos de lactobacilos (*Lactobacillus* sp. 25 e sp. 20). Um grupo se inclui no gênero *Weissella* (*Lactobacillus* sp. 21) e outro no gênero *Oenococcus* (BL7). A metodologia ARDRA havia preliminarmente identificado 3 grupos de isolados como lactobacilos e um grupo não havia sido identificado (BL7). Porém **a identificação pelo gene *phe*S mostrou claramente que os isolados pertencem a diferentes gêneros de BAL**. Portanto, a metodologia ARDRA pode ser considerada limitada para identificar espécies do gênero *Lactobacillus*, especialmente aquelas cuja posição pode ser considerada incerta. Conforme mencionado na Seção 3.1.3, a taxonomia do gênero ainda apresenta questões em aberto, sendo exemplos típicos os grupos de espécies *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. plantarum*, que incluem linhagens cuja identificação não é tarefa simples (DESAI, SHAH & POWELL, 2006; TORRIANI, FELIS & DELLAGLIO, 2001; KULLEN et al., 2000).

As linhagens de *Lactobacillus* sp. 25 formaram um agrupamento bastante individualizado dentro do grupo *L. buchneri*. É muito provável que algumas destas linhagens sejam espécies distintas, devido à divergência que apresentam entre si (Fig. 6.1). É possível também que alguns isolados sejam espécies novas. A linhagem tipo mais próxima foi *L. diolivorans*, com 82,7% de similaridade com o isolado TR7.3.17. Esta espécie foi isolada de uma silagem de milho (KROONEMAN et al., 2002) e não havia sido detectada em processos bioetanol, em contrate com as espécies relacionadas *L. buchneri, parabuchneri* e *hilgardii* (BISCHOFF, SKINNER-NEMEC & LEATHERS, 2007; SCHELL et al., 2007; SKINNER-NEMEC, NICHOLS & LEATHERS, 2007; SKINNER & LEATHERS, 2004; GALLO, 1989). Tendo em vista que a identificação vem sendo feita com base em propriedades metabólicas, é possível que a inexistência de relatos da presença de *L. diolivorans* em processos bioetanol seja conseqüência da ineficácia dos testes empregados. Em estudo recente, incluindo isolados do processo bioetanol, a identificação fenotípica não distinguiu as espécies *L. parabuchneri* e *L. oris* (SKINNER-NEMEC, NICHOLS & LEATHERS, 2007). O gene RNAr 16S também é limitado para distinguir algumas espécies deste grupo. Naser e colaboradores (2007) demonstraram que dificilmente este gene apresentará resolução para distinguir *L acidifarinae* de L. *zymae*, ao contrário do gene *phe*S, capaz de discriminá-las.

Os três isolados *Lactobacillus* sp. 20 foram claramente identificados como *L. vini*. O gene *phe*S da amostra tipo desta espécie foi seqüenciado para o presente estudo e a seqüência gerada será depositada no GenBank. Um dos isolados apresentou 100% de similaridade com *L. vini* tipo, e as duas outras, cerca de 99%. Em uma planta industrial de produção de etanol a partir de amido de trigo, foi verificada a predominância de *D. bruxellensis* e *L. vini* em meio a grande quantidade de bactérias láticas. Tendo em vista a elevada qualidade do produto, produtividade e estabilidade do processo, tal associação foi considerada favorável para a produção comercial de etanol (PASSOTH, BLOMQVIST & SCHNÜRER, 2007). No Brasil, *D. bruxellensis* foi identificada como a principal levedura contaminante, durante toda a safra, das plantas industriais nordestinas, em estudo realizado por Liberal e colaboradores (2007). Nesse trabalho a diversidade bacteriana não foi investigada. Como os isolados de *Lactobacillus* sp. 20 são provenientes do nordeste, supõe-se que as espécies *D. bruxellensis* e *L. vini* coexistem em usinas desta região, cabendo

então verificar se esta sugestão é verdadeira e, em caso positivo, os efeitos desse binômio sobre o processo bioetanol de cana-de-açúcar.

Quanto aos grupos *Lactobacillus* sp. 21 e BL7, que não agruparam dentro do gênero *Lactobacillus*, também foi realizado o sequenciamento do rRNA16S completo. A árvore filogenética resultante do alinhamento destas seqüências encontra-se representada na Figura 6.2. Houve concordância na identificação destes grupos, sp. 21 e BL7, como Weissella e Oenococcus, respectivamente. Os isolados *Lactobacillus* sp. 21, foram identificados por ambas as árvores, como *W. paramesenteroides*. Esta espécie, bem como *W. confusa* e *viridescens* já foram identificadas dentre contaminantes de processo bioetanol (SKINNER & LEATHERS, 2004). O gênero *Weissella* foi descrito a partir de um grupo de espécies até então nomeadas *Leuconostoc paramesenteroides*. Naquele momento foram descritas 7 espécies de *Weissella*, incluindo as espécies já isoladas de bioetanol (COLLINS et al., 1993).

Os isolados BL7/*Oenococcus* apresentam apenas 75% de similaridade com a espécie *O. oeni*, de acordo com o sequenciamento do *phe*S. Pelo sequenciamento do rRNA16S – cerca de 1500 nts – a espécie mais próxima é *O.kitaharae* com apenas 94,8% de similaridade com os isolados. A espécie *O.kitaharae* não apresenta seqüência do *phe*S depositada, por isso não foi incluída na árvore deste gene. A similaridade de seqüência total do rRNA16S < 97% em relação à espécie mais próxima (e > 93%), informa que BL7, representado por dois isolados neste trabalho, é uma espécie nova de *Oenococcus* a ser descrita (LUDWIG & KLENK, 2001; STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994).

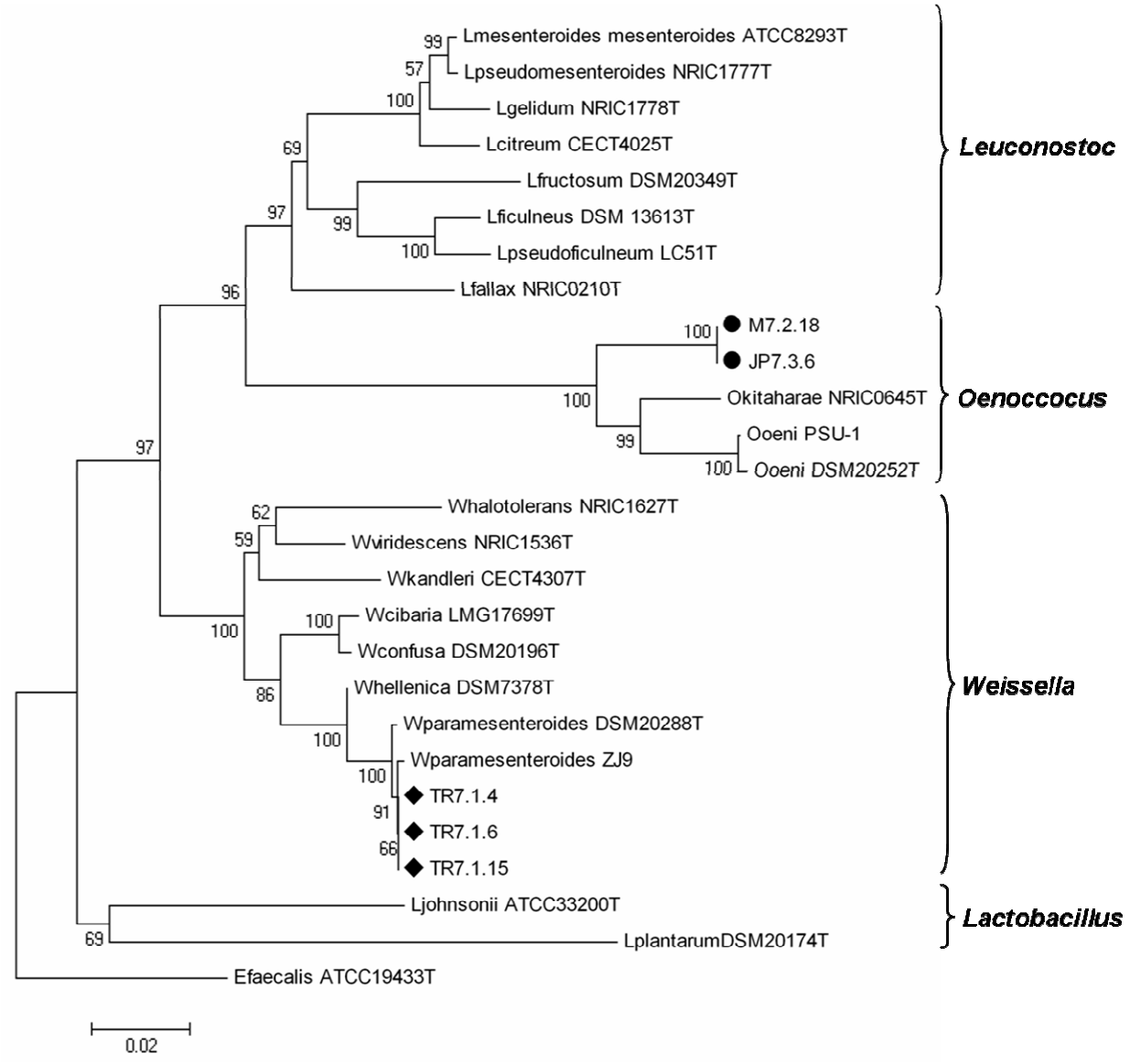

Figura 6.2: Árvore *Neighbor-Joining* representativa dos gêneros *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella* e *Lactobacillus*, baseada em sequências parciais do **rRNA 16S** de linhagens tipo e de isolados do processo bioetanol. A significância está representada pelo valor de *bootstrap* (%) calculado com base em 1000 réplicas. Apenas valores acima de 50% estão representados. A barra de escala representa 2% de diferença. A nomenclatura dos isolados foi estabelecida de acordo com a identificação prévia realizada com a técnica ARDRA. **CÍRCULO**: BL7 e **LOSANGO**: *Lactobacillus* sp 21. *Enteroccocus faecalis* foi incluído como *outgroup*

O gênero *Oenoccocus*, foi descrito em 1995 e compreende duas espécies. *O. oeni*, anteriormente *Leuconostoc oenos* e *O.kitaharae*, proveniente de resíduos de compostagem. Ambas as descrições incluíram estudos de HDD. Até a descrição de *O.kitaharae*, propriedades distintivas do gênero *Oenococcus* eram acidofilia, capacidade de realizar fermentação malolática, o requerimento de fator suco de tomate para o crescimento, e tolerância ao etanol a 10% (v/v). *O.kitaharae* não

apresenta nenhuma destas propriedades e linhagens desta espécie possivelmente teriam sido identificadas erroneamente, como pertencentes a outro gênero, com base em testes bioquímicos (ENDO & OKADA, 2006; DICKS, DELLAGLIO & COLLINS, 1995).

6.1.2 Caracterização fenotípica dos isolados BL7 pertencentes à espécie nova de *Oenococcus*

Os isolados M7.2.18 e JP7.3.6, provenientes das usinas Miriri e Japungu (PB), respectivamente, e representativos do grupo BLT/ *Oenococcus* foram submetidos a 95 testes bioquímicos, reunidos em microplaca do sistema GP2 Biolog. Os resultados comparativos dos isolados em relação às duas outras espécies do gênero estão apresentados na Tabela 6.1.

Em relação às características avaliadas para as 4 linhagens, conforme se observa, nenhuma apresentou resultado positivo ou negativo para todas as linhagens. As propriedades distintivas dos isolados em relação às duas outras espécies são a capacidade de utilização de D-manitol e sacarose e a incapacidade de utilização de D-celobiose.

Algumas características variam de acordo com a linhagem, como a utilização de D-galactose, α-D-lactose e salicina, a utilização desta última sendo variável também para as espécies descritas do gênero. A utilização da D-celobiose pode ser um fator de exclusão, pois o resultado foi negativo para ambos os isolados e para as espécies descritas, em alguns casos, é possível a utilização deste açúcar (os resultados foram DL= dependente da linhagem e V=variável; de acordo com a nomenclatura dos autores: Endo & Okada, 2006, e Dicks, Dellaglio & Collins, 1995; respectivamente).

Tabela 6.1: Comparação das propriedades metabólicas dos isolados BL7 - M7.2.18 e JP7.3.6 - com relação às duas outras espécies do gênero, *O. oeni* e *kitaharae*

Açúcar/Ácido/Amido	M 7.2.18	JP 7.3.6	*O. kitaharae*[a]	*O. oeni*[b]
L-Arabinose	+	+	-	+
D-Celobiose	-	-	DL	V
D-Frutose	+	+	+	-
D-Galactose	-	+	+	V
D- Àcido Glucônico	+	+	+	ND
α-D-Glucose	+	+	+	-
α-D-Lactose	+	-	-	-
Maltose	-	-	+	-
D-Manitol*	+	+	-	-
D-Melezitose	-	-	+	ND
D-Manose	+	+	+	V
D-Melibiose	+	+	+	V
D-Rafinose	+	-	+	-
L-Ramnose	-	-	-	ND
D-Ribose	+	+	+	ND
D-Sorbitol	-	-	-	ND
Salicina	+	-	DL	V
Sacarose*	+	+	-	-
D-Xilose	+	+	-	+
D-Trealose	-	-	+	+

+: reação positiva; -: reação negativa; ND: não determinado; DL: dependente da linhagem; V: variável
*somente os isolados são capazes de utilizar como fonte de carbono
[a] Endo & Okada, 2006 ; [b] Dicks, Dellaglio & Collins, 1995

OBS.: Nesta tabela foram incluídos os testes realizados com os isolados e pelo menos uma das duas espécies descritas do gênero.

A linhagem M 7.2.18 apresentou 16/95 resultados positivos, sendo capaz de utilizar as seguintes fontes de carbono: amigdalina, L-arabinose, D-frutose, ácido D-glucônico, α-D-glucose, α-D-lactose, D-manitol, D-manose, D-melibiose, α-metil-D-glicosidase, ß-metil-D-glicosidase, palatinose, D-rafinose, L-ramnose, D-ribose, salicina, sacarose, D-xilose, ácido metil éster D–lático e glicerol. A linhagem JP 7.3.6 apresentou 11/95 resultados positivos, mostrando-se capaz de utilizar N-acetyl-D-glicosamina, gmigdalina, L-arabinose, D-frutose, D-galactose, ácido D-glucônico, α-D-glucose, D-manitol, D-manose, D-melibiose, ß-metil-D- glicosidase, sacarose e D-xilose.

Outras características importantes na comparação entre os isolados e as espécies descritas são o requerimento de fator suco de tomate para crescimento e tolerância ao oxigênio (Tabela 6.2).

Tabela 6.2: Comparação dos isolados M7.2.18 e JP7.3.6 com relação às duas outras espécies do gênero, *O. oeni* e *kitaharae*, quanto ao requerimento de fator suco de tomate para o crescimento e tolerância ao oxigênio:

Característica	M7.2.18	JP7.3.6	*O. kitaharae*[a]	*O. oeni*[b]
Exige fator suco de tomate	não	não	não	sim
Tolerância ao oxigênio	boa	boa	Anaeróbios facultativos, porém o	
Cresce sob microaerofilia	sim	sim	crescimento é favorecido sob	
Cresce sob anaerobiose	sim*	sim*	anaerobiose	

* O crescimento não é favorecido sob anaerobiose. Crescem lentamente em meio sólido (MRS) nas três tensões de oxigênio testadas.
[a] Endo & Okada, 2006 ; [b] Dicks, Dellaglio & Collins, 1995

Quanto ao requerimento de nutrientes presentes em suco de tomate (ou suco de uva), como ácido pantotênico, os isolados assemelham-se à espécie *O. kitaharae*, que também é capaz de crescer em MRS sem suplementos. Quanto á tolerância ao oxigênio, em MRS os isolados cresceram igualmente nas três condições testadas. O crescimento em meio sólido é lento (48 a 76h), e as colônias são brancas e diminutas (1 a 2 mm), nas três tensões de oxigênio.

Outras características relevantes para a caracterização dos isolados BL7/*Oenoccocus* são a tolerância ao etanol, pH ótimo para crescimento, e a capacidade de transformar L-malato em D-(+)-lactato na presença de um açúcar fermentável. *O. oeni* se distingue de *O. kitaharae* quanto às três características: (i) tolera 10 % (v/v) de etanol em caldo, enquanto o limite para *O. kitaharae* é de 5 %; (ii) realiza fermentação malolática e *O. kitaharae* não, e (iii) é acidófilo sendo 4,8 o pH ótimo para crescimento, bem inferior à faixa de 6,0 a 6,8 preferida por *O. kitaharae*. Apesar destas diferenças enunciadas e outras incluídas na descrição das espécies, a descrição de *O. kitaharae* só foi possível com a realização de ensaios de HDD, efetuados conforme descrito por Ezaki e colaboradores (1989). Os valores de hibridização variaram de 25-30% entre os isolados de *O. kitaharae* e a linhagem tipo de *O. oeni*, enquanto entre si, os valores de hibridização obtidos para os isolados variaram de 90 a 100% (ENDO & OKADA, 2006).

ETAPA 2: Estabelecimento de nova metodologia para identificação de procariontes com base na determinação de ΔTm usando rtPCR

Os trabalhos foram realizados segundo Gonzalez & Saint Jimenez (2005, 2002), com linhagens de vibrios patógenos de corais e algumas linhagens de vibrios patógenos humanos. Os resultados de ΔTm obtidos foram confrontados com dados pretéritos obtidos para os pares de linhagens ensaiados, de acordo com a vasta literatura disponível sobre HDD com linhagens de vibrios. Durante a implementação da metodologia foi de vital importância os valores prévios de HDD como referência, na validação dos resultados obtidos (Figura 5.1). Conforme ficou evidente no capítulo 2 (Fig. 2.3), existe uma expectativa de correlação entre valores de HDD (%) e ΔTm (^{o}C). Embora para esta correlação (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001; Fig. 2.3) tenham sido utilizados dados de ΔTm produzidos por método espectrofotométrico, o método fluorimétrico estabelecido baseia-se nas mesmas propriedades físico-químicas que permitem a desnaturação e renaturação térmicas do DNA. Foram realizados ensaios de ΔTm com 19 pares de vibrios, cujos valores prévios de HDD variam de 22 a 99%. Em relação ao conteúdo de GC, foram utilizadas 9 linhagens com conteúdo de GC variando de 41 a 50%. Para lactobacilos, a literatura sobre o tema não é tão rica, especialmente quanto aos valores de HDD. Possivelmente, o principal apelo para os estudos era o fato de que *V. cholerae* é o agente etiológico da doença cólera, responsável por diversas pandemias (FARUQUE & NAIR, 2006). Outras espécies são patógenos de peixes e invertebrados marinhos como corais (Seção 3.2) e vêm sendo exaustivamente estudadas com inúmeras descrições de novas espécies recentemente, quase todas incluindo valores de HDD. É possível que a patogenicidade (para humanos e animais) tenha atuado como fator determinante para esforços sistemáticos, desde os primórdios da abordagem polifásica (Fig.2.1), no sentido de discriminar espécies do gênero, culminado com maior volume de dados específicos, os quesitos HDD e conteúdo de GC.

6.2.1 ΔTm em plataforma de rt PCR

Os resultados de ΔTm obtidos encontram-se listados na Tabela 6.3. Estão apresentados de modo comparativo em relação aos resultados descritos pelos autores da técnica (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ,2005). Em ambos os casos os valores pretéritos de HDD estão apresentados. À esquerda estão relacionados os dados produzidos neste trabalho, divididos em 4 blocos, segundo o grupo de espécies relacionadas a seguir (de cima para baixo): *cholerae*/*mimicus*, *coralliilyticus*/*neptunius*, *harveyi*/*campbellii*, e demais pares que não se incluem nos grupos anteriores. À direita estão relacionados os dados produzidos por Gonzalez & Saint Jimenez (2005) para 9 pares de hipertermofílicos pertencentes aos gêneros *Thermococcus* e *Pyrococcus*, e por Jurado e colaboradores (2008) para o par de *Nocardia* (*N. altamirensis e N. tenerifensis*). Não foram incluídos na tabela resultados obtidos para pares com valores de HDD inferiores a 20% e para DNAs homólogos (e que constam do artigo original) (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ,2005). Pares de linhagens com valores de HDD inferiores a 20% não apresentam elevada similaridade de genoma completo e dificilmente seriam necessários ensaios de HDD para identificação/descrição.

Tabela 6.3: Comparação entre os valores de ΔTm (°C) obtidos para 19 pares de vibrios patógenos de corais com os respectivos valores pretéritos de HDD (%); e valores de ΔTm (°C) de Gonzalez & Saint Jimenez (2005), e Jurado e colaboradores (2008), também com os respectivos valores pretéritos de HDD (%):

DADOS OBTIDOS			DADOS DA LITERATURA			
	Pares de Linhagens[1]	ΔTm[a] (°C)	HDD (%)		ΔTm[b] (°C)	Pares de Linhagens[2]
I	*V.cholerae* LMG 21698T - *V.cholerae* ElTor R-18308	3.47	99			
	V.cholerae LMG 21698T - *V.cholerae* Amazon R-18337	6.67	96			
	V.cholerae LMG 21698T - *V.mimicus* LMG 7896T	6.67	79			
II	*V. coralliilyticus* LMG 20984T - *V. coralliilyticus* LMG10953	2.76	98	90	2.1	*T. peptonophilus* OG1–*T. peptonophilus* SM2
	V. coralliilyticus LMG 21349 - *V. coralliilyticus* LMG10953	1.92	89	86-89	3.4	*T. litoralis* NS-C–*T. litoralis* A3
	V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. coralliilyticus* LMG 21349	3.78	87	83-87	2.7	*P. furiosus subsp.woesei–P. furiosus*
	V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. neptunius* RFT5	5.76	66			
	V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. neptunius* CAIM 536T	8.75	64	50-63	8.7	*P. furiosus – P. horikoshii*
	V. coralliilyticus LMG10953 - *V. nereis* LMG 3895T	5.5	30	32-36	8.3	*P. horikoshii – P. abyssi*
	V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. nereis* LMG 3895T	12.47	29.5	29	7	*N. tenerifensis* T- *N.altamirensis* T
	V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. brasiliensis* LMG20010	10.96	26			
	V. coralliilyticus LMG 20984T - *V. xuii* STD3-1204	11.96	24			
III	*V.harveyi* LMG 4044T - *V.harveyi* LMG 20370	3.8	71			
	V.harveyi LMG 4044T - *V. Campbellii* LMG 11216T	5.2	69			
	V.harveyi LMG 4044T - *V. campbellii* R-14899	4,35	59			
	V.harveyi LMG 4044T - *V. alginolyticus* LMG 4409T	7.15	46	45-36	13.1	*P. furiosus – P. abyssi*
	V.harveyi LMG 4044T - *V. natriegens* LMG 10935T	10.17	35	36	10.5	*P. abyssi –T. celer*
IV	*V.splendidus* LMG 19031T - *V. chagasii* R-3712T	3.35	54	50	6.3	*P. furiosus – T. celer*
	V. orientalis LMG 7897T - *V. mytili* LMG 19157T	10	22	25	10.2	*P. horikoshii – T. celer*

[1]Presente estudo; [2] Gonzalez & Saint Jimenez (2005): pares de linhagens com valores de HDD > 20%; Jurado e colaboradores (2008): *N. tenerifensis* T- *N.altamirensis* T. [a] ΔTm (°C) deste trabalho; [b] ΔTm (°C) da literatura. I: Grupo *cholerae*/*mimicus*; II: Grupo *coralliilyticus*/*neptunius*, III: Grupo *harveyi*/*campbellii;* IV Pares de vibrios não relacionados aos grupos I, II e III.
OBS: Os dois valores de HDD (%), para alguns pares de linhagens[2], foram obtidos por diferentes autores

Conforme se pode verificar, no trabalho de Gonzalez & Saint Jimenez (2005) o intervalo compreendido entre 60 a 80% de reassociação de DNA por HDD, denominado faixa cinza, praticamente não foi explorado. É este, justamente, o intervalo crítico para validar a aplicabilidade de uma nova metodologia em taxonomia, pois pode facilmente resultar em identificação errônea. A alcunha faixa cinza alude ao fato de que a discriminação de espécies tão proximamente relacionadas, em termos de similaridade de genoma completo, é "nebulosa", e frequentemente requer o emprego de outras abordagens para confirmar os resultados de HDD. Gonzalez & Saint Jimenez (2005) incluíram apenas um par de espécies nesse intervalo, cujo valor pretérito de HDD foi de 50 e 63, segundo diferentes autores. No presente estudo foram incluídos 6 pares de espécies com valores de HDD entre 59 e 80%. O par de espécies de *Nocardia* refere-se ao trabalho publicado na IJSEM incluindo a descrição da espécie *N. altamirensis.* Apesar dos autores terem incluído o dado referente ao ΔTm (7 ^{o}C em relação à *N. tenerifensis*) parece que não foram eximidos da realização da HDD segundo a técnica padrão (JURADO et al., 2009).

A correlação obtida entre os valores de ΔTm e HDD pretéritos encontra-se na Figura 6.3 (ACIMA), a qual pode ser comparada à curva gerada por Gonzalez & Saint Jimenez (2005) (ABAIXO). As curvas apresentadas nesta figura também devem ser comparadas à curva gerada com os dados referentes a 111 pares de espécies compilados por Roselló-Mora & Amann (2001) (Figura 2.3). As áreas hachureadas em cinza no gráfico construído com os dados do presente estudo (Figura 6.3, ACIMA) ou delimitadas por linhas tracejadas no gráfico de Gonzalez & Saint Jimenez (Figura 6.3, ABAIXO) correspondem aos intervalos de incerteza observados por Roselló-Mora & Amann (2001) para as duas técnicas [HDD e ΔTm (método espectrofotmétrico)]. Na área hachureada foram incluídas 10 observações (presente estudo) e na área delimitada pelas linha tracejadas foi incluída apenas 1 observação. No gráfico adaptado de Gonzalez & Saint Jimenez, abaixo da linha cheia paralela à abscissa estão os pontos referentes a pares de espécies com valores de HDD < 20%, não incluídas na Tabela 6.3. Destes 4 pontos, três são referentes a DNAs híbridos provenientes de espécies de diferentes gêneros. Nesse mesmo gráfico, a seta indica resultados obtidos para DNAs homólogos e não para pares de espécies relacionadas.

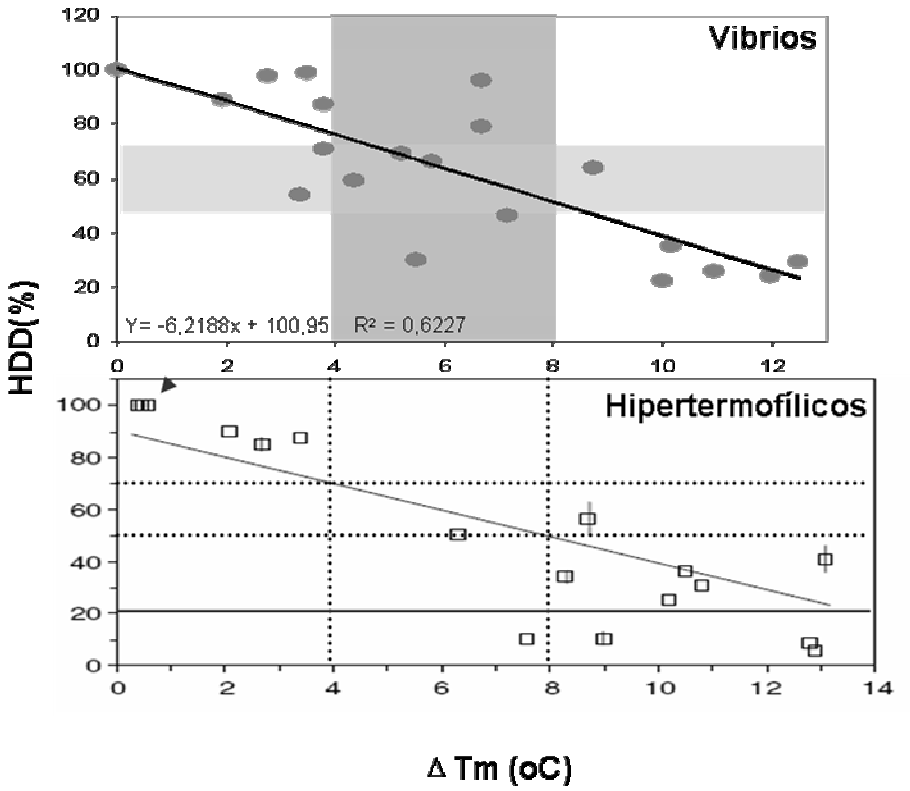

Figura 6.3: ACIMA: Correlação entre os resultados de ΔTm obtidos e os valores pretéritos de HDD, segundo a metodologia convencional, para 19 pares de **vibrios**. **ABAIXO** (adaptado de Gonzalez & Saint Jimenez, 2005): Correlação obtida por Gonzalez & Saint Jimenez (2005) entre os resultados de ΔTm obtidos para **hipertermofílicos** e os valores pretéritos de HDD, segundo a metodologia convencional. A seta indica pontos que não são referentes a pares de espécies, mas sim DNAs homólogos. Abaixo da linha cheia paralela à abscissa estão os pontos referentes a pares com valores de HDD < 20% (não incluídos na Tabela 6.3).

É possível observar que para os 19 pares de vibrios, foram obtidos 4 resultados *outliers*, todos dentro área hachureada no gráfico (Fig. 6.3, ACIMA), correspondente à faixa de incerteza delimitada por Roselló-Mora & Amann (2001) (Fig. 2.3). Estes pontos são referentes aos seguintes pares de espécies e respectivos valores de ΔTm e HDD:

1) *V.cholerae* LMG 21698^T - *V.cholerae* Amazon R-18337: 6,67 ^{o}C – 96%
2) *V.cholerae* LMG 21698^T - *V.mimicus* LMG 7896^T: 6,67 ^{o}C – 79%
3) *V.harvey* LMG 4044^T - *V.campbellii* R-14899: 4,35 ^{o}C – 59%
4) *V.splendidus* LMG 19031^T - *V. chagasii* R-3712^T: 3,35 ^{o}C – 54 %

Com relação ao par *V.cholerae* LMG 21698^T - *V.mimicus* LMG 7896^T, espécies diferentes, o valor inusitado é o de 79% para HDD (Thompson el al.,

2003c). Davis e colaboradores (1981) obtiveram valor de 67% para HDD entre essas mesmas linhagens. Com relação aos pares *V.cholerae* LMG 21698^T - *V.cholerae* Amazon R-18337; *V.harvey* LMG 4044^T - *V.campbellii* R-14899, e *V.splendidus* LMG 19031^T - *V. chagasii* R-3712^T, foi realizado apenas um ensaio (com triplicatas). Para os demais pares, foram realizados de 2 a 5 experimentos (com triplicatas). É possível que com mais repetições os valores obtidos sofram pequena alteração. Além disso, Ben-Haim e colaboradores (2003), para estudos de HDD com espécies isoladas de corais, relataram desvios padrão da ordem de 10 a 20%, em alguns casos. São exemplos as hibridizações de *V. coralliilyticus* YB1^T e *V. coralliilyticus* LMG10953 (98 % +/- 13); *V. coralliilyticus* LMG 21349 e *V. nereis* LMG 3895^T (30 % +/- 6), *V. coralliilyticus* LMG 21349 e *V. tubiashii* LMG 10936^T (26 % +/- 5). No trabalho de Goris e colaboradores (1998), bem como no de Willems e colaboradores (2001), o erro médio das estimativas de HDD em microplacas (EZAKI el al., 1989) foi de 7%. Portanto, o erro associado à metodologia clássica também resulta em alguma distorção na avaliação da metodologia estabelecida.

A correlação entre ΔTm (^oC) e HDD (%) observada (Figura 6.3, ACIMA) é descrita pela equação:

$$Y= -6,2188 + 100,95 \quad (7)$$

Roselló-Mora & Amann (2001) (Figura 2.3) encontraram a seguinte correlação:

$$Y= -5,0501 + 90,329 \quad (8)$$

Os resultados reunidos por Roselló-Mora & Amann (2001) incluíram dados de ΔTm obtidos pelo método espectrofotométrico para um total de 111 pares de linhagens de diferentes grupos taxonômicos. Estes dados foram gerados por diferentes grupos de pesquisa, tendo sido referentes a todas as publicações envolvendo HDD e ΔTm no IJSEM durante um ano (Seção 2.3.2). Os dados aqui apresentados, quando acrescidos de resultados a serem obtidos para bactérias láticas, possivelmente serão refinados. A tendência é que, com o acréscimo de medidas, seja determinada uma correlação estável entre ΔTm (^oC) e HDD (%), para

o sistema estabelecido, e que pode se aproximar mais daquela encontrada por Roselló-Mora & Amann (2001). Também é provável que com o acréscimo de observações, seja verificado aumento do valor de R^2.

Apesar dos 4 pontos *outliers* na curva ΔTm (^oC) e HDD (%) gerada com todos os resultados, na faixa cinza, entre 60 e 80% de HDD, foram obtidos valores de ΔTm discriminatórios para 4 pares de linhagens intimamente relacionadas. Os valores de HDD determinados previamente para estes 4 pares de linhagens variam de 64 a 71% (Figura 6.4).

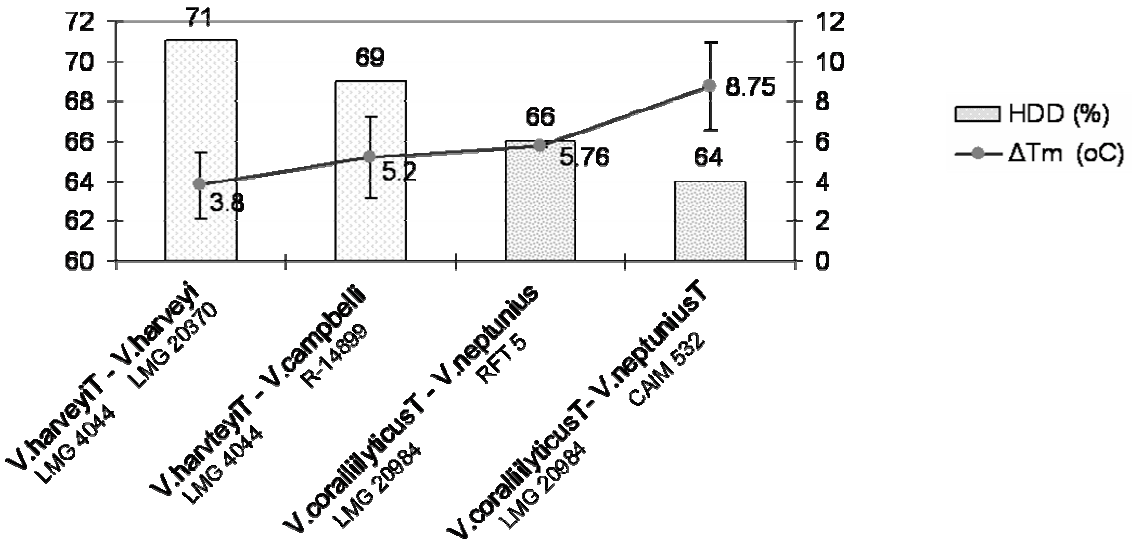

Figura 6.4: Valores de HDD (%) na ordenada à esquerda, e de ΔTm (^oC) na ordenada à direita, para 4 pares de linhagens intimamente relacionadas.

Para as 2 linhagens de *V. harveyi*, o valor de 3,8 ^oC de ΔTm confirma que são a mesma espécie (n= 12). Para os outros 3 pares de linhagens, os valores de ΔTm > 5,0 ^oC discriminam espécies irmãs [*V. harveyi* LMG 4044^T - *V. campbellii* R-14899 (n = 15), *V. coralliilyticus* LMG 20984^{T} - *V. neptunius* RFT 5 (n = 3), e *V. coralliilyticus* LMG 20984^T – *V. neptunius* CAIM 532^T (n= 12)].

Os três grupos distintos quanto à faixa de HDD, correspondem a três grupos distintos quanto à média dos valores de ΔTm, segundo o método fluorimétrico estabelecido (Fig. 5.2.3). Para pares de linhagens com valores de HDD entre 20 e 59%, a média dos valores de ΔTm obtidos foi de 8,43. Para pares de linhagens com

valores de HDD entre 60 e 80%, a média dos valores de ΔTm obtidos foi de 6,04. Para pares de linhagens com valore de HDD entre 81 e 100%, a média dos valores de ΔTm obtidos foi de 3,72. Portanto fica evidente que nos intervalos de HDD de 20-59% e 81-100% a metodologia implementada funciona muito bem.

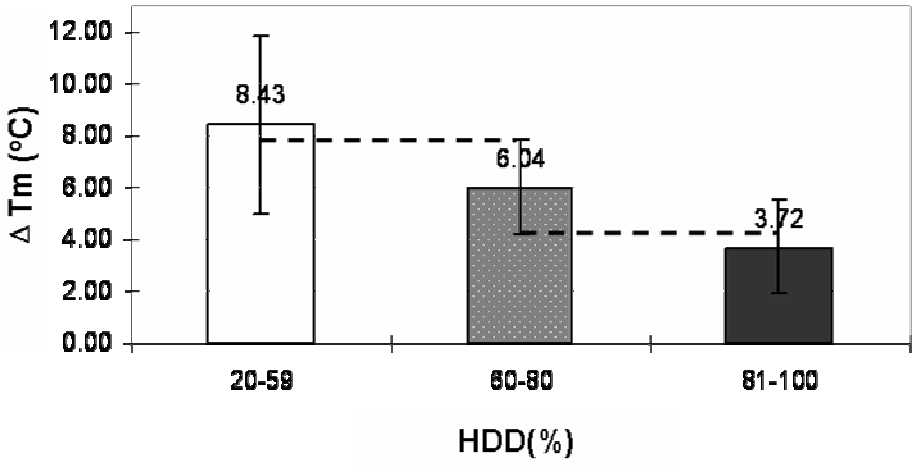

Ilustração 6.5: Aos três grupos distintos quanto à faixa de HDD, correspondem três grupos distintos quanto à média dos valores de ΔTm, determinada pelo método fluorimétrico estabelecido. Para o grupo de linhagens com valores de HDD entre 20 e 59%, a média dos valores obtidos de ΔTm é 8,43. Para o grupo de linhagens com valores de HDD entre 60 e 80%, a média dos valores obtidos de ΔTm é 6,04. Para o grupo de linhagens com valores de HDD entre 81 e 100%, a média dos valores obtidos de ΔTm é 3,72.

A limitação observada na faixa de 4 a 8 ^{o}C de ΔTm, conforme delimitado pelas linhas tracejadas, (Fig. 6.3) já havia sido observada anteriormente em estudo envolvendo 111 pares de linhagens (ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001) (Figura 2.3, área hachureada delimitada pelas linhas paralelas à ordenada). Para estudos visando a identificação de espécies desconhecidas, nos casos de obtenção de valores de ΔTm entre 4 e 8 ^{o}C, deve ser empregada uma abordagem polifásica, com o sequenciamento do rRNA16S completo e/ou MLSA. Essa estratégia vai ao encontro das diretrizes vigentes. O padrão para delineação de espécies é a técnica de hibridização DNA-DNA, sendo recomendado que toda descrição de nova espécie inclua o sequenciamento de fragmento com mais de 1300 nts do rRNA16S (STACKEBRANDT et al., 2002).

6.2.2 %GC em plataforma de rt PCR

Para os ensaios de ΔTm com os vibrios patógenos de corais estudados, o cálculo da T_{OR} para hibridização dos DNAs, foi realizado com os valores de %GC da literatura. Porém quando as linhagens forem desconhecidas, como é o caso dos isolados M7.2.18 e JP7.3.6 (BL7) provenientes do processo bioetanol, é necessário a determinação da %GC para cálculo da T_{OR}.

A determinação da %GC pelo método fluorimétrico com o uso de plataforma de rtPCR baseia-se na construção de curva padrão correlacionando as Tms de espécies cujo conteúdo de GC é conhecido, com os respectivos valores de %GC. Idealmente, essa curva padrão deve incluir espécies cujos conteúdos de GC tenham sido obtidos pelo sequenciamento do genoma completo. Dessa forma é possível evitar possíveis distorções decorrentes do erro associado aos métodos indiretos utilizados para a determinação do teor de GC do genoma. Além disso, deve incluir a mais ampla faixa de conteúdo de GC possível (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ, 2002).

Para estabelecimento da metodologia foram realizados ensaios com 9 espécies de vibrios, com conteúdo de GC variando entre 41,5 e 50,4 %. No gênero V*ibrio*, a amplitude do conteúdo de GC se estende de 38 a 51,9 % (BAUMANN & SCHUBERT, 1984).

Na figura 6.6 estão ilustradas as curvas de desnaturação e suas derivadas obtidas para os DNAs das linhagens *V. hispanicus* LMG 13240^T (42,8 %GC), *V. kanaloae* INCO 191^T (44, 7 %GC) e *V. furnissii* LMG 7910^T (50,4 %GC). As Tms obtidas da derivação das curvas de desnaturação foram 77,44 ^oC para *V. hispanicus* LMG 13240^T; 78,96 ^oC para *V. kanaloae* INCO 191^T, e 82,29 ^oC para *V. furnissii* LMG 7910^T. Estes resultados são representativos do conjunto de resultados realizados para obtenção da correlação entre %GC e Tm para vibrios.

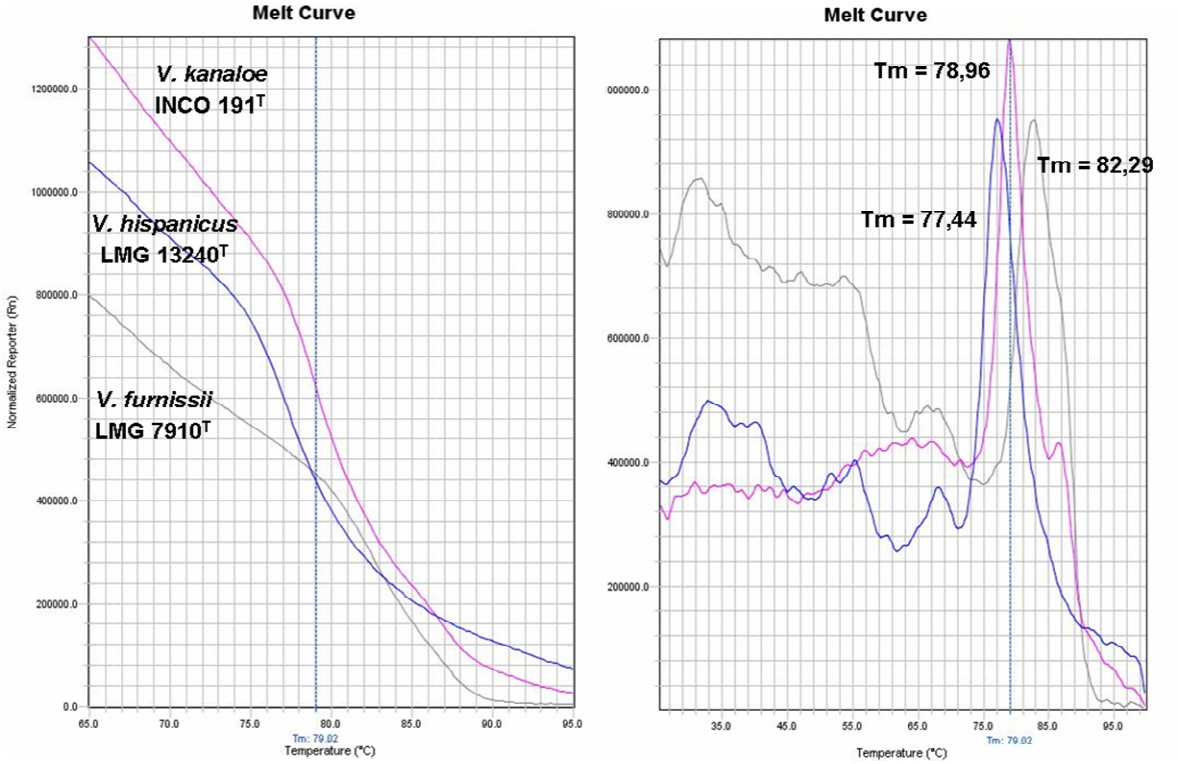

Figura 6.6: ESQUERDA: curvas de desnaturação dos DNAs das linhagens *V. hispanicus* LMG 13240^T (42,8 %GC), *V. kanaloae* INCO 191^T (44, 7 %GC) e *V. furnissii* LMG 7910^T (50,4 %GC). **DIREITA**: 1ª derivada negativa das curvas de desnaturação, cujo valor máximo corresponde às Tms das linhagens, respectivamente, 77,44, 78,96 e 82,29 ^oC.

A figura 6.7 apresenta a correlação entre as Tms (^oC) obtidas e a %GC, segundo dados da literatura, para os 9 vibrios avaliados (à direita). Na mesma figura foi incluída a correlação obtida pelos autores da metodologia para 6 espécies com conteúdo de GC nessa faixa estudada (à esquerda): *Pyrococcus furiosus* DSM 3638^T (40,77 %GC) ; *Pyrococcus horikoshii* DSM 12428^T (41,88 %GC) ; *Bacillus subtilis* Strain 168 (43,52 %GC) ; *Pyrococcus abyssi* Strain GE5^T (44,71 %GC) ; *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304^T (48,58 %GC) ; *Escherichia coli* K12 (50,79 %GC).

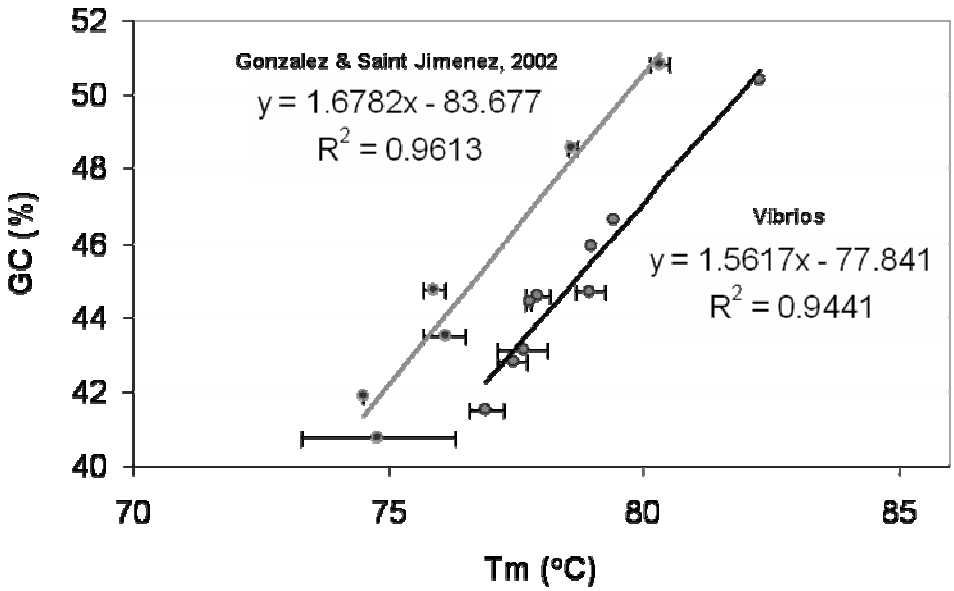

Figura 6.7: Correlação entre Tm determinada fluorimetricamente com uso de plataforma de rtPCR e %GC de acordo com dados da literatura. À direita curva gerada com os resultados obtidos e à esquerda curva determinada pelos pontos experimentais obtidos pelos autores da metodologia (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ, 2002) para 6 espécies com %GC na mesma faixa dos vibrios avaliados.

Os valores de conteúdo de GC dos vibrios foram obtidos por HPLC, enquanto para as linhagens incluídas por Gonzalez & Saint Jimenez (2002) esses valores foram obtidos dos dados do sequenciamento do genoma completo. Essa diferença com relação ao método de obtenção do conteúdo de GC pode explicar a diferença entre as equações das duas curvas. Além disso, os equipamentos utilizados para os experimentos foram diferentes nos dois casos. Os resultados para os vibrios foram gerados em um modelo 7500 (Applied Biosystems) e o estudo com de Gonzalez & Saint Jimenez (2002) foi realizado com um iCycler (Biorad). No artigo original (GONZALEZ & SAINT JIMENEZ, 2002) a curva construída com todos as espécies incluídas no estudo é descrita pela equação:

$$\%GC = 1.98\ Tm - 106.91 \quad (9)$$

Essa correlação foi determinada por um conjunto de 11 observações na faixa de de 30 a 63% de GC. Portanto, a inclusão de outras espécies, por exemplo de bactérias láticas, ampliando a faixa de conteúdo de GC, na curva padrão construída

exclusivamente com vibrios, deve promover o ajuste da correlação Tm x %GC observada.

6.2.3 Considerações gerais

O ambiente nos reatores onde é conduzida a fermentação alcoólica para produção de etanol apresenta uma diversidade pouco conhecida, incluindo outros gêneros BAL além daquele mais estudado, os lactobacilos. O gene *phe*S apresenta poder discriminatório para identificar estas espécies BAL, porém o sequenciamento do RNAr 16S também contribui para a identificação na medida em que os bancos de dados são mais completos. Estudos fenotípicos complementam os dados dos estudos moleculares na caracterização das espécies identificadas e fornecem informações relevantes com respeito a diferenças entre linhagens. Ademais, não se pode prescindir desta abordagem para a descrição de novas espécies (STACKEBRANDT et al., 2002).

O uso de rtPCR em substituição ao espectrofotômetro térmico alia precisão, praticidade e rapidez aos estudos taxonômicos, especialmente para a descrição de novas espécies. No Brasil, o ganho em rapidez é maior tendo em vista que dispensa a remessa de material microbiológico para a Europa.

O estabelecimento da nova metodologia terá um grande impacto sobre aplicações tecnológicas envolvendo taxonomia. Um exemplo é a necessidade de autenticação em coleções de cultivo. No Brasil as coleções oferecem basicamente culturas puras, informações técnicas sobre as culturas e seu cultivo e eventualmente serviços de liofilização de culturas. São 60 as coleções nacionais registradas no *World Data Center for Microorganisms* (WDCM), de um total de 568 coleções de 68 países (WDCM Statistics, 2009). Exemplos de coleções de bactérias nacionais são a Coleção de Culturas Tropical (CCT), da Fundação André Tosello (FAT); a Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas (CCBD), da EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; e as coleções de bactérias da FIOCRUZ - Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Outro exemplo é o estudo de misturas complexas de DNA (ou metagenomas) (TORSVIK, 1998). A nova metodologia deve permitir a

comparação de metagenomas, como por ex. o metagenoma do processo produtivo do bioetanol e o metagenoma da microbiota de corais.

Capítulo 7

Conclusões, sugestões e perspectivas

7.1 Conclusões

Em relação aos estudos realizados na primeira etapa do trabalho com linhagens BAL isoladas do processo bioetanol, concluiu-se que:

i) A técnica ARDRA reuniu grupos de isolados que de fato correspondem a grupos taxonômicos distintos de BAL. Porém sua resolução taxonômica é limitada e não permite delimitar espécies novas;

ii) O sequenciamento gênico permitiu claramente a identificação dos 4 grupos de isolados previamente reunidos (ARDRA), tendo discriminado outros gêneros BAL além de *Lactobacillus*. Permitiu ainda a identificação, em nível de espécie, de *Weissella paramesentoides* e indicou a presença da nova espécie de *Oenococcus*.

Em relação à nova metodologia estabelecida para determinação da ΔTm fluorimetricamente com uso de plataforma de rtPCR na segunda etapa do trabalho, concluiu-se que:

iii) É possível a economia de 7 dias em comparação com o método clássico de Ezaki e colaboradores (1989);

iv) Para pares de linhagens com valores de ΔTm dentro do intervalo de 4 a 8 ^{o}C é recomendável a aborfagem polifásica, com o sequenciamento do rRNA 16S completo e de outras metodologias para a confirmação da identificação;

v) Ainda com relação ao parâmetro ΔTm, devem ser comparadas espécies proximamente relacionadas. Espécies de gêneros diferentes ou mesmo gênero, porém muito distantes, podem fornecer resultados discrepantes.

7.2 Sugestões

Com relação à nova metodologia implementada, as seguintes sugestões são essenciais para sua reprodutibilidade e eficácia:

i) A qualidade do DNA é fator crítico para a eficácia do método. Os DNAs a serem comparados devem ser extraídos segundo a mesma metodologia e devem apresentar as seguintes características: A_{260}:A_{280} entre 1,8 e 2,0; e A_{260}: A_{230} > 2,0. O ajuste da concentração do DNA também é fator crítico e deve ser usado o mesmo método e equipamento para todas as amostras.

ii) A calibração do equipamento de rtPCR também é importante para a eficácia do método. O modelo 7500 (AB) requer calibração *background*, *custom dye* e ótica, que devem ser feitas regularmente (de acordo com o uso).

7.3 Perspectivas

A metodologia de obtenção de ΔTm e %GC fluorimetricamente com uso de plataforma de rtPCR encontra-se implementada e os protocolos para realização dos ensaios estão padronizados para o equipamento 7500 (AB).

A próxima etapa, de acordo com o planejamento idealizado (Fig. 4.1), é a realização dos ensaios de ΔTm com bactérias láticas isoladas do processo

bioetanol. A necessidade imediata são os isolados BL7/*Oenococcus* que representam uma nova espécie a ser descrita.

Pretende-se ainda ensaiar diversos pares de linhagens BAL de modo a ajustar a correlação obtida para ΔTm x HDD. Espera-se que a correlação a ser gerada apresente argumento suficiente para a descrição de espécies novas, ou seja, para dispensar a exigência da realização de HDD pelo método clássico. O impacto desse avanço será observado não apenas no âmbito da identificação de isolados do bioetanol, uma vez que a técnica de identificação pode ser aplicada para todos os procariontes. Poderá ser empregada para obtenção de patentes, certificação, autenticação e diagnóstico além de outros.

Com relação à determinação da % GC serão ensaiadas diversas linhagens BAL, vibrios isolados de corais (40B e 1DA3; THOMPSON, VICENTE & THOMPSON, 2009) e espécies tipo com genoma seqüenciado. O uso de linhagens com genoma completo seqüenciado e uma maior amplitude de conteúdo de GC permitirão ajuste da curva padrão. A determinação da % GC é importante para a descrição e caracterização de espécies novas, para a realização dos ensaios de ΔTm com linhagens desconhecidas.

Em relação ao sistema estabelecido, algumas avaliações podem ser efetuadas com vistas ao incremento da acurácia:

i) Há fluoróforos que podem ser testados como Evagreen e Syto9;

ii) O uso de DNA fragmentado nos estudos de ΔTm, conforme realizado na metodologia espectrofotométrica, pode contribuir para agilizar a formação dos híbridos; e

iii) O acompanhamento da cinética de renaturação é outra estratégia a ser ensaiada para reduzir o tempo de experimentação.

Com relação às aplicações da metodologia, ambos os estudos ΔTm e % GC podem ser testados na avaliação comparativa de comunidades microbianas, com o

uso de DNA metagenômico. Nesse caso são requeridos maiores investimentos, em termos de tempo e recursos, para avaliação da viabilidade e implementação.

Em relação aos trabalhos concluídos acredita-se que a contribuição foi significativa tanto no âmbito acadêmico, quanto no âmbito das aplicações da taxonomia microbiana, especificamente no estudo da diversidade presente no processo bioetanol e de bactérias marinhas.

Capítulo 8

Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n.17, p. 3389-3402, set. 1997.

AMORIM, H V. **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Editora Fermentec, 2005, 454p.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H.. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2, 1981, Águas de São Pedro. **Anais do Congresso Nacional da STAB**, Águas de São Pedro, 1981, P. 158-168.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, n. 7, p. 1-16, out. 2006.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 310-317, jan. 2010.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F. D. M.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, A. H.. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 5, 1993, Águas de São Pedro. **Anais do Congresso Nacional da STAB**, Águas de São Pedro, 1993, p. 45-49.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Estudo comparativo de leveduras isoladas de processo industrial. Piracicaba, ESALQ/USP, 1995. p. 51-106 (**Relatório Anual de Pesquisa em Fermentação Alcoólica**, 15).

BAUMANN, P.; SCHUBERT, R. H. W. Family II. *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245[AL]. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1984. p. 516–517.

BELLWOOD, D. R.; HUGHES, T. P.; FOLKE, C.; NYSTRÖM, M. Confronting the coral reef crisis. **Nature**, v. 249, n. 6994, p. 827-833, jun. 2004.

BEN-HAIM, Y.; ROSENBERG, E. A novel *Vibrio* sp. Pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Mar Biol**, v. 141, p. 47–55, abr. 2002.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON. F. L.; THOMPSON, C.C.; CNOCKAERT, M. C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; ROSENBERG, E. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 309-315, jan. 2003.

BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus.* **Appl Envir Microbiol***,* v. 69, n. 3, p. 4236–4242, jul. 2003.

BISCHOFF, M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotech Bioeng**, v.9, n.1, p. 117-122, maio, 2009.

BISCHOFF, K. M.; SKINNER-NEMEC, K. A.; LEATHERS, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 11, p. 739–744, ago. 2007.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D.; APONTE, M.; PEPE, O.; VILLANI, F. *Lactobacillus* strain diversity based on partial *hsp*60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p. 208-215, jan. 2008.

BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento e CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**, Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316p.

BONETTA, L. Prime time for real-time PCR. **Nat Methods**, v. 2, n.4, p. 305-312, abr. 2005.

BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral Pocillopora damicornis from the Great Barrier Reef. **Environ Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 1162-1174, dez. 2005.

BORZANI, W. Fermentação semicontínua. In: SCHIMIDEL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**, v. 2. São Paulo, Edgard Blücher, 2001, p. 219 - 222.

BRASIL. Decreto-lei nº 6.041, de fevereiro de 2007**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 fev. 2007. Seção 1, p. 1.

BRENNER, D. J.; HICKMAN-BRENNER, F. ; LEE, J. V. ; STEIGERWALT, A. G.; FANNING, G. R.; HOLLIS, D. G.; FARMER, J. J.; WEAVER, R. E.; JOSEPH, S. W.; SEIDLER, R. J. *Vibrio furnissii* (Formerly Aerogenic Biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. **J Clin Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 816-824, out. 1983.

BRUGNARO, C.; SBRAGIA, R. **Gerência agrícola em destilarias de álcool**. 2. ed. Piracicaba: Ministério da Indústria e do Comércio, 1986. 212 p.

CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, dnaA, gyrB, rpoC and dnaK. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 276-286, fev. 2007.

CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; THOMPSON, C. C.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **J Appl Microbiol**, v. 106, n. 6, p. 1818-1826, jun. 2009.

CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; THOMPSON, C. C.; MARTINS, R. C.; RAMOS, H. R.; THOMPSON, F. L. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Syst Appl Microbiol**, v. 31, n. 4, p. 312-319, set. 2008.

CLAESSON, M. J. ; VAN SINDEREN, D. ; O`TOOLE, P. W. The genus Lactobacillus - a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiol Lett**, v. 269, p. 22-28, abr. 2007.

COLE, J. R., CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, D. J. M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Res**, 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889, 2007.

COLLINS, M. D.; SAMELISL, J.; METAXOPOULOS J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J Appl Bacteriol**, v. 75, n. 6, p. 595-603, dez. 1993.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **J BACTERIOL**, v. 104, p. 410-33, out. 1970.

COUDEYRAS, S.; MARCHANDIN, H.; FAION, C.; FORESTIER, C. Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 9, p. 2679-2680, maio, 2008.

DAVIS, B. R.; FANNING, G. R.; MADDEN, J. M.; STEIGERWALT, A. G.; BRADFORD, H. B.; SMITH, H. L.; BRENNER, D. J. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **J. Clin. Microbiol**, v.14, n. 6, p. 631–639, dez. 1981.

DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; GALLO, G.; CURCI, M.; SIRAGUSA, S.; CRECCHIO, C.; PARENTE, E.; GOBBETTI, M. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. **Int J Food Microbiol**, v. 114, p. 69-82, jan. 2007.

DESAI, A. R.; SHAH, N. P.; POWELL, I. B. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 9, p. 3345–3351, set. 2006.

DE LEY, J.; CATTOIR, H.; REYNAERTS, A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. **Eur J Biochem**, v. 12, p. 133-142, jan.1970.

DE VUYST, L.; VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiol**, n. 24, v. 2, p. 120-127, set. 2006.

DICKS, L. M. T.; DELLAGLIO, F.; COLLINS, M. D. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 4, n. 2, p. 395-397, abr. 1995.

ENDO, A.; OKADA, S. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. 10, p. 2345-2348, out. 2002.

EUZÉBY, J. P. LPSN - ***List of prokaryotic names with standing in nomenclature***, 1998-2008, disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/ ou http://www.bacterio.net>. Acesso em: 22 dez. 2009.

EUZÉBY, J. P. LPSN - ***List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature***. Genus *Lactobacillus*. 2010. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html> Acesso em: 7 fev. 2010.

EZAKI, T.; HASHIMOTO, Y.; YABUUCHI, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. **Int J Syst Bacteriol**, v. 39, n.3, p. 224-229, jul. 1989.

FADIEL, A.; LITHWICK, S.; NAFTOLIN, F. The influence of environmental adaptation on bacterial genome structure. **Lett Appl Microbiol**, n. 40, p. 12-18, jul. 2005.

FARUQUE, S. M.; NAIR, G.B. Epidemiology. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (eds). **The biology of vibrios**. Washington D.C.: ASM Press, 2006. p. 385-398.

FELIPE M. G. A. Termo de Referência. In: **I *Workshop* Produção de Etanol**, 2006, Lorena, USP – EEL - Escola de Engenharia de Lorena. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/termo_referencia_etanol.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2009.

FELIPE M. G. A. Termo de Referência. In: **XIV *Workshop* Produção de Etanol: Qualidade da Matéria-Prima**, 2008, Lorena, USP - EEL - Escola de Engenharia de Lorena. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Termo_de_Referencia_qualidade_MP.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2009.

FELIS, G.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Curr Iss Intest Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 44–61, set. 2007.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSHUCK, P. JR. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Int J Syst Bacteriol**.; v. 42, p. 166–170, jan.1992.

FRANCINI-FILHO, R. B.; MOURA, R. L.; THOMPSON, F. L.; REIS, A. M.; KAUFMAN, L.; KIKUCHI, R. K.; LEÃO, Z. M. Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). **Mar Pollut Bull**, v. 56, n. 5, p. 1008-1014, maio, 2008.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e dornas de **fermentação alcoólica**. 1989. 388p. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1989.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Procaryotes. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2. ed., Release 5.0, New York: Springer-Verlag, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>. Acesso em: 22 dez. 2009.

GENBANK - *GenBank Overview*. NCBI, ***National Center for Biotechnology Information***, 2009; disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. Acesso em: 22 dez. 2009.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 9, p. 733–739, set. 2005.

GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANDAMME, P.; WILLEMS, A.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; DE VOS, P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1475, p. 1911-1916, nov. 2006.

GOMEZ-GIL, B.; SOTO-RODRIGUEZ, S.; GARCIA-GASCA, A.; ROQUE, A.; VAZQUEZ-JUAREZ, R.; THOMPSON. F. L.; SWINGS, J. Molecular identification of *Vibrio harvey i*related isolates associated with diseased aquatic organisms. **Microbiol**, v. 150, n.6, p. 1769–1777, jun. 2004b.

GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F.L.; THOMPSON, C.C.; THOMPSON, A.; GARCIA-GASCA, A.; ROQUE, A.; SWINGS, J. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, p. 261-265, jan. 2004a.

GONZALEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. **Environ Microbiol**, v. 4, n. 11, p. 770-773, nov. 2002.

GONZALEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. **Extremophiles**, v. 9, p. 75-79, fev. 2005.

GORIS, J.; SUZUKI,K.; DE VOS, P.; NAKASE, T. ; KERSTERS, K. Evaluation of a microplate hybridization method compared with initial renaturation method. **Can J Microbiol**, v. 44, n. 12, p.1148-1153, 1998.

GRIMONT, P. A. D..; POPOFF, M. Y.; GRIMONT, F.; COYNAULT, C.; LEMELIN, M. Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. **Curr Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 325–330, nov. 1980.

HEDLUND, B. P.; STALEY, J. T. *Vibrio cyclitrophicus* sp. Novel , a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)- degrading marine bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 61-66, jan. 2001.

HEID, C.; STEVENS, J.; LIVAK, K.; WILLIAMS, P. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10, p. 986–994, out. 1996.

HUGHES, T. P.; BAIRD, A H.; BELLWOOD, D. R.; CARD, M.; CONNOLLY, S. R.; FOLKE, C.; GROSBERG, R.; HOEGH-GULDBERG, O.; JACKSON, J. B.; KLEYPAS, J.; LOUGH, J. M.; MARSHALL, P.; NYSTRÖM, M.; PALUMBI, S. R.; PANDOLFI, J. M.; ROSEN, B.; ROUGHGARDEN, J. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. **Science**, v. 301, n. 5635, p. 929-933, ago. 2003.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnol (NY)**, v. 10, n. 4, p. 413-417, abr. 1992.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoration of DNA amplification reactions. **Biotechnol (NY)**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, set. 1993.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, ago. 1991.

JAHNKE KD. A modified method of quantitative colorimetric DNA–DNA hybridization on membrane filters for bacterial identification. **J Microbiol Methods**, v. 20, n. 4, p. 273–288, nov.1994.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Rev Microb**, v. 22, p. 12-16, 1991.

JURADO, V.; BOIRON, P.; KROPPENSTEDT, R. M.; LAURENT, F.; COUBLE, A.; LAIZ, L.; KLENK, H. P.; GONZÁLEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C.; MOUNIÉE, D.; BERGERON, E.; RODRÍGUEZ-NAVA, V. *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, n. 9, p. 2210-2214, set. 2008.

KIKUCHI, R. K. P.; LEÃO, Z. M. A. N.; OLIVEIRA, M. D. M.; DUTRA, L.X.C. ; CRUZ, I. C. Branqueamento de corais nos recifes da Bahia associado aos efeitos do El Nino 2003. II Congresso sobre Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras dos Países de Expressão Portuguesa, IX Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário e II Congresso do Quaternário dos Países de Língua Ibéricas, 2003, Recife. **Anais do II Congresso sobre Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras dos Países de Expressão Portuguesa**, Rio de Janeiro, 2003. p. 213.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A. C.; OUDE ELFERINK, S. J. H. W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J. C.; VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 639-646, m. 2002.

KULLEN, M. J.; SANOZKY-DAWES, R. B.; CROWELL, D. C.; KLAENHAMMER, T. R. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. **J Appl Microbiol**, v. 89, n. 3, p. 511-516, set. 2000.

KUSHMARO, A.; LOYA, Y.; FINE, M.; ROSENBERG, E. Bacterial infection and coral bleaching. **Nature**, v. 380,n. 6573, p. 396, abr. 1996.
KUSHMARO, A.; ROSENBERG, E.; FINE, M.; LOYA, Y. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 147, p.159–165, fev. 1997.

LEJA, K.; BRODA, M. The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment**, v. 8, n. 4, p. 25-31, out./dez. 2009.

LIBERAL, A. T. S.; BASÍLIO, A. C. M.; RESENDE, A. M.; BRASILEIRO, B. T. V.; DA SILVA FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F.; SIMO, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **J Appl Microbiol**, v. 102, n. 2, p. 538-547, fev. 2007.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Cienc Tecnol Aliment (Campinas)**, v. 21, p. 63-68, jan/abr. 2001.

LUDWIG, W.; KLENK, H. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: **Bergey's Manual of Systematics Bacteriology**. 2. ed. Berlim: Springer-Verlag, 2001. p. 49-65.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. In: **Bergey's Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines Volume 3**, 2009. p. 1-24. Disponível em: <http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf> Acesso em: 4 jan. 2010.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário Estatístico da Agroenergia**, Brasília: MAPA/ACS, 2009. 160p.

MARMUR, J.; DOTY, P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. **J Mol Biol**, v. 5, p. 109–118, jul.1962.

MISSAWA, S. K.; CUNHA, A. F.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA , S. R.; PEREIRA, G. A. G. The study of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation in industrial ethanol production. In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador. **Anais eletrônicos**. Salvador: SBBq, 2007.

NASER, S.M.; DAWYNDT, P.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Identification of *Lactobacilli* by *phe*S and *rpo*A gene sequence analyses. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, n. 12, p. 2777-2789, dez. 2007.

NASER, S. M.; THOMPSON. F. L; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpo*A and *phe*S genes. **Microbiol**,v. 151, n. 7, p. 2141-2150, jul. 2005.

NCBI - **National Center for Biotechnology Information** - Entrez Nucleotide. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Acesso em: 22 dez. 2009.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V.G.; CONSOLI, M.A. **Mapeamento e Quantificação do Setor Sucroenergético em 2008**, Ribeirão Preto: MARKESTRAT/FUNDACE, 2009. 34p. Disponível em: <http://www.unica.com.br/download.asp?mmdCode=56AB20A4-6153-40E4-9A3A-8C33F1C7ED36>. Acesso em: 22 dez. 2009.

OLIVA-NETO P. Efeito de fatores inibidores na fermentação alcoólica. In: **XIV *Workshop* Produção de Etanol: Qualidade da Matéria-Prima**, 2008, Lorena, USP - EEL - Escola de Engenharia de Lorena. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/position_paper_painel3_pedro_oliva.pdf> Acesso em: 22 dez. 2009.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effect of 3,4,4'-trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. **Biores Technol**, v. 63, p. 17-21, jan. 1998.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, maio, 2007.

PEREIRA, N. JR.; BON, E. B. S.; FERRARA, M. A. **Séries em Biotecnologia**: **Tecnologia de Bioprocessos.** Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008, 62 p.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Lett in Appl Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 151-156, mar. 1989.

POPOFF, M. Y.; COYNAULT, C. Use of DEAE-cellulose filters in the S1 nuclease method for bacterial deoxyribonucleic acid hybridization. **Ann Microbiol (Paris)**, v. 131A, n. 2, p. 151–155, mar./abr. 1980.

PRIEST, F.; AUSTIN, B. **Modern Bacterial Taxonomy**. 2. ed. Londres: Chapman & Hall, 1993. 278 p.

PUBMED – U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health. **National Center for Biotechnology Information**. Real-time PCR. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Acesso em: 1 fev. 2010.

REIS, A. M.; ARAÚJO, S. D. JR.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS, G. JR.; COELHO, A. M.; KRÜGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **J Appl Microbiol**, v. 106, n. 4, p. 1378-1387, abr. 2009.

RITCHIE, K. B.; DENNIS, J. H.; MCGRATH, T.; SMITH, G. W. Bacteria associated with bleached and nonbleached areas of *Monastraea annularis*. **Proc Symp Nat Hist Bahamas**, v. 5, p. 75-80, 1994.

RITZ, K.; GRIFTHS, B. S.; TORSVIK, V. L.; HENDRIKSEN, N. B. Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profles and reassociation kinetics. **FEMS Microbiol Lett**, v. 149, n. 2, p. 151-156, jan. 1997.

ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, K. Diversity and distribuition of coral-associated bacteria. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 243, p. 1-10, nov. 2002.

ROSENBERG, E.; KOREN, O.; RESHEF, L.; EFRONY, R.; ZILBER-ROSENBERG, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 5, p. 355-362, maio, 2007.

ROSSELLÓ-MORA, R. **DNA–DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation**. Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes. Berlim Heidelberg: E.Stackebrandt (Ed.) Springer-Verlag, 2006. p. 23-28.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes.**FEMS Microbiol Rev**, v, 25, p. 39–67, jan. 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 4, p. 406-25, jul. 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (eds.). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SAWABE, T.; SUGIMURA, I.; OHTSUKA, M.; NAKANO, K.; TAJIMA, K.; CHRISTEN, R. *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 48, n.2, p. 573-580, abr. 1998.

SCHEIRLINCK, I.; VANDERMEULEN, R.; VRANCKEN, G.; DE VUYST, L.; SETTANNI, L.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Polyphasic taxonomic characterization of *Lactobacillus rossiae* isolates from Belgian and Italian sourdoughs reveals intraspecific heterogeneity. **Syst Appl Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 151-156, abr. 2009.

SCHELL, D.J.; DOWE, N.; IBSEN, K.N.; RILEY, C.J.; RUTH, M.F.; LUMPKIN, R.E.. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Biores Technol**, v.98, n. 15, p. 2942–2948, nov. 2007.

SCHILDKRAUT, C. L.; MARMUR, J.; DOTY, P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. **J Mol Biol**, v.3, n.5, p. 595-617, out. 1961.

SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Syst Appl Microbiol**, v. 18, p. 461–467, 1995.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 31, n. 9, p. 401-408, ago. 2004.

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnol Lett**, v. 29, n.3, p. 379–383, dez. 2007.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J. TRÜPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the *ad hoc* committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 1043–1047, maio, 2002.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, D. M. Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int J Syst Bacterio**.; v. 44, n. 4, p. 846–849, out.1994.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, B. Lactic acid bactéria of foods and their current taxonomy. **Int J Food Microbiol**, v. 36, p. 1-29, abr. 1997.

TAMAOKA, J.; KOMAGAWA, K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **FEMS Microbiol Lett**, v. 25, p. 125-128, jul.1984.

TAMURA, K.; DUDLEY J.; NEI, M.; ; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, ago. 2007.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends Ecol Evol**, v. 18, n.2, p. 70-74, fev. 2003.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **J Appl Microbiol**, v. 90, n. 5, p. 819-828, jan. 2001.

THOMPSON, C.C.; VICENTE, A. C. P.; THOMPSON, F. L. Genomic taxonomy of vibrios. **BMC Evol Biol** , v. 27, n. 9, p. 258-273, out. 2009.

THOMPSON, F.L. **Improved taxonomy of the family *Vibrionaceae***. 2002/2003. 268p. Tese de doutorado (*Doctor in Sciences – Biochemistry*) – *Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology – Faculty of Sciences – Ghent University*, Bélgica, 2003.

THOMPSON, F.L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.M.; HOSTE, B.; MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of Multilocus Sequence Analysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 9, p. 5107-5115, set. 2005b.

THOMPSON. F. L.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, C.C.; HOSTE, B.; VANDERMEULEBROECKE, K.; RUPP, G.S.; PEREIRA, A.; DE BEM, M. M.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 245-252, jan. 2003a.

THOMPSON, F. L.; GOMEZ-GIL, B.; VASCONCELOS, A. T.; SAWABE, T. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. **Appl Environ Microbiol**, n. 73, n. 13, p. 4279-4285, jul. 2007.

THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; THOMPSON, C.C.; SWINGS, J. The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. **Syst Appl Microbiol**, v. 24, n. 4, p. 516-519, dez. 2001a.

THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. **Syst Appl Microbiol**, v. 24, n. 4, p. 520-538, dez. 2001b.

THOMPSON. F. L; OLIVEIRA, V. M.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; INÁCIO, C. A.; SELEGHIM, M. H. R.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus. Brasília: **CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2005a, 50 p.

THOMPSON. F. L.; THOMPSON, C.C.; GOMEZ-GIL, B.; VANDENBERGHE, J.; HOSTE, B.; SWINGS, J. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 753-759, maio, 2003b.

THOMPSON, F.L.; THOMPSON, C.C.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, M. G.; SWINGS, J. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, n. 5, p. 1495-1501, set. 2003d.

THOMPSON, F.L.; THOMPSON, C.C.; VICENTE, A. C. P..; THEOPHILO, G. N. D.; HOFER, E.; SWINGS, J. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **J Clin Microbiol**, v. 4, n. 5, p. 1946-1950, maio, 2003c.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, .v 22, n. 22, p. 4673- 4680, nov. 1994.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. **Appl Env Microbiol**, v. 67, n. 8, p. 3450–3454, ago. 2001.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R.; ØVREAS, L. N ovel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **J Biotechnol**, v. 64, p. 53–62, set.1998.

UNICA. Mistura obrigatória é base das políticas de estímulo aos biocombustíveis, **BRASILAGRO**, 2008. Disponível em: <http://www.brasilagro.com.br/noticias.php?id=10415>. Acesso em: 22 dez. 2009.

WDCM Statistics - ***World Data Center for Microorganisms***. The Culture Collection in this world. Disponível em : < http://wdcm.nig.ac.jp/statistics.html>. Acesso em: Acesso em: 22 dez. 2009.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 2, p. 407-438, jun. 1996.

VANDENBERGHE, J.; THOMPSON, F. L.; GOMEZ-GIL, B.; SWINGS, J. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 219, n. 1-4, p. 9-20, abr. 2003.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D,; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRÜPER, H. G. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **Int J Syst Bacteriol**, v. 37, n.4, p. 463–464, out. 1987.

WILLEMS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; GORIS, J.; COOPMAN, R.; DE LAJUDIE, P.; DE VOS, P.; GILLIS, M. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1315-1322, jul. 2001.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 74, n. 11, p. 5088-5090, nov. 1977.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Série Ciência XXI: Biologia molecular básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 424 p.

ZECHIN, M. R. Internacionalização do Etanol: Oportunidades e Desafios ao Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, **ENCOMEX** - Encontros em Comércio Exterior, 139, 2009, São José do Rio Preto. Disponível em: <http://www.encomex.desenvolvimento.gov.br/default/encontros/realizados/item/58>. Acesso em: 22 dez. 2009.

ZIEMKE, F.; HOFLE, M. G.; LALUCAT, J.; ROSSELLÓ-MORA, R. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella báltica* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 48, n. p. 179-186, jan. 1998.