



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Filogenia e perfil plasmidial de
Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo**

Juliana Capella de Orem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlene Teixeira De-Souza

Brasília, 2014

Para os meus avós, Lecy e Gilson (com saudades!) que sempre me diziam que a educação era o maior bem que eles poderiam me dar... E estavam certos!

Agradecimentos

Ao meu marido, Luiz Augusto, por todo o apoio, incentivo, paciência e companheirismo.

À minha mãe, Cláudia, pelo incentivo e por escutar meus desabafos.

Aos meus colegas de laboratório, Flávia e Danilo, pelas discussões relevantes e pelas conversas de cafezinho. Agradeço também por contribuírem para tornar o nosso laboratório um lugar tão agradável de se trabalhar.

Aos professores Alex Pereira Leite, Lidia Maria Pepe de Moraes, Ricardo Henrique Krüger, Robert Neil Gerard Miller, Sônia Maria Freitas e à Dra. Tainá Raiol pela contribuição direta para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço ainda aos alunos do Prof. Krüger, Elisa e Fabyano pela ajuda e paciência.

Agradeço, principalmente, à minha orientadora, professora Marlene, pela confiança no meu trabalho, pela dedicação, pela compreensão, pelos conselhos, pela amizade e por tudo o que vem me ensinando desde o primeiro dia que cheguei ao seu laboratório.

Resumo

A endoesporulação constitui uma estratégia bacteriana de sobrevivência extremamente eficiente. Bactérias aeróbias formadoras de endósporo (Bafes) são isoladas dos mais diversos ambientes e acredita-se que essas tenham papel fundamental na ecologia destes sítios. As Bafes estão distribuídas em mais de 25 famílias e 200 gêneros dentro do filo *Firmicutes* que abriga bactérias em maioria Gram positivas, com baixo conteúdo G+C e parede celular muito rígida. A formação de endósporos é a característica mais marcante do filo, porém nem todas as linhagens possuem habilidade de esporular. As Bafes apresentam grande potencial biotecnológico e sua importância abrange diversas áreas como, por exemplo, médica, agrícola, ecológica e de biodefesa. Apesar da importância, as Bafes, coletivamente, são pouco estudadas. O conhecimento que existe hoje sobre esses microrganismos é extrapolado a partir do estudo de espécies individuais, notadamente o *Bacillus subtilis* e *B. cereus* e espécies relacionadas. Neste trabalho, foi avaliada a diversidade de Bafes isoladas de solo do Distrito Federal, por meio de filogenia baseada na comparação de sequências de genes rRNA 16S e do perfil plasmidial. O trabalho foi realizado com 45 linhagens denominadas SDF que fazem parte do acervo da coleção CBafes do Laboratório de Microbiologia/ LaBafes da UnB. Os dados obtidos durante a realização deste trabalho indicam uma grande diversidade entre as linhagens ambientais.

Abstract

The endospore formation process is an extremely efficient strategy for bacterial survival. Aerobic endospore forming bacteria are isolated from the most diverse environments and it is likely that they play a major role in the ecology of those sites. These bacteria are allocated in more than 25 families and 200 genera within the Phylum *Firmicutes*. Most of the bacteria allocated in this Phylum stain Gram positive, have low G+C content and a very thick cell wall. The endospore formation is the main feature of the Phylum, but the ability to form spores is not present in all lineages. The aerobic endospore forming bacteria have great biotechnological potential and are of great importance to medical, agricultural, ecological and biodefense fields. Despite of their importance, there is little investigation on aerobic endospore forming bacteria. The present knowledge about them is extrapolated from studies on individual species, like *Bacillus subtilis*, *B. cereus* and related species. In this work it was assessed the diversity of aerobic endospore forming bacteria, isolated from Distrito Federal soil, by phylogeny based on comparison of 16S rRNA genes sequences and also by plasmid pattern. This study was performed with 45 lineages called SDF that belong to the collection of the Microbiology Laboratory/LaBafes of UnB. The data obtained in this work indicate a great diversity among the environmental lineages.

Sumário

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Lista de abreviaturas	iii
1. Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. Filo <i>Firmicutes</i>	1
1.2. Bactérias aeróbias formadoras de endósporos.....	2
1.3. Esporulação	3
1.4. Taxonomia de Bafes.....	8
1.5. Plasmídeos de Bafes.....	13
1.6. Estudos filogenéticos.....	16
1.7. Genes de rRNA 16S	19
2. Justificativa	22
3. Objetivos	24
3.1. Objetivos Gerais.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. Material e métodos	25
4.1. Linhagens	25
4.2. DNA total	25
4.3. Amplificação de rDNA 16S	27
4.4. Purificação dos produtos de PCR.....	27
4.5 Sequenciamento	27
4.6. Construção das árvores filogenéticas	27
4.7. Extração de DNA plasmidial.....	28
5. Resultados e Discussão	29
5.1. Análise de perfil plasmidial.....	31
5.2. Filogenia por rDNA 16S	38
5.2.1. Extração de DNA total	38
5.2.2. Amplificação e sequenciamento dos genes de rRNA 16S	38
5.2.3. Construção das árvores filogenéticas	44
7. Conclusão e perspectivas	51
8. Referências bibliográficas	52

Lista de figuras

Figura 1. Representação dos estágios da esporulação	5
Figura 2. Ultraestrutura de esporos	7
Figura 3. Células de <i>B. subtilis</i> em esporulação	8
Figura 4. Estruturas de peptidoglicano	12
Figura 6. Árvore filogenética universal.....	19
Figura 7. Perfil plasmidial de linhagens SDF de Bafes isoladas de solo do DF.....	33
Figura 8. Perfil plasmidial de linhagens SDF de Bafes isoladas de solo do DF.....	35
Figura 9. Perfil plasmidial de linhagens SDF de Bafes isoladas de solo do DF	36
Figura 10. Análise do produto da amplificação de genes de rRNA 16S.....	39
Figura 11. Árvore filogenética inconsistente	45
Figura 12. Árvore filogenética	46
Figura 13. Filogenia de linhagens SDF.....	47
Figura 14. Filogenia de linhagens SDF.....	48
Figura 15. Filogenia de linhagens SDF.....	48
Figura 16. Filogenia de linhagens SDF.....	49
Figura 17. Filogenia de linhagens SDF.....	49

Lista de tabelas

Tabela I. Características fenotípicas de linhagens da CBafes	26
Tabela II. Obtenção de protoplastos e plasmídeos (por lise alcalina) das linhagens selecionadas	32
Tabela III. Identificação de linhagens SDF por comparação de sequencias de genes de rRNA 16.....	42
Tabela IV. Classificação de linhagens SDF utilizadas neste estudo por genes rRNA 16S	43
Tabela V. Espécies usadas como referência nas análises filogenéticas	44

Lista de abreviaturas

Bafes — Bactérias aeróbias formadoras de endósporo

Cbafes — Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo

DF — Distrito Federal

LaBafes — Laboratório de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo

MCF — Microscopia de contraste de fase

MET — Microscopia eletrônica de transmissão

NCBI — National Center for Biotechnology Information

nt — Nucleotídeos

OTU — Unidades taxonômicas operacionais (do inglês, *operational taxonomic units*)

pb — Pares de bases

PC — Parede Celular

RDP — Ribosomal Database Project

SDF — Solo do Distrito Federal

TGH — Transferência gênica horizontal

TU — Unidades taxonômicas (do inglês, *taxonomic units*)

UV — Ultravioleta

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Filo *Firmicutes*

O recém criado filo *Firmicutes* (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004; Garrity, 2003) consiste em quatro classes — *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia* e *Negativicutes* — dentre as quais estão alocadas pelo menos 26 famílias e 223 gêneros. Todos os membros possuem uma parede celular (PC) rígida e a maioria é Gram positiva, entretanto, alguns podem ser Gram negativos. O filo é fenotipicamente diverso, com células esféricas, retas, curvadas e em bastões helicoidais ou filamentosos e podem ou não apresentar flagelo. Algumas linhagens são aeróbias, facultativas ou anaeróbias estritas e parte é termófila e/ou halófila. Apesar de a maioria ser quimio-organotrófica, alguns membros são fotoheterotróficos anoxigênicos. O crescimento ótimo, *in vitro*, da maioria das espécies se dá em pH neutro, mas também já foram descritas espécies acidófilas ou alcalífilas. O percentual de G e C (%G+C) no genoma é geralmente <50%.

Uma característica marcante do filo é a formação de endósporos (deste ponto designado apenas como esporos) observada em algumas linhagens, tanto aeróbias quanto anaeróbias, que, entretanto, não constitui uma característica universal do filo (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004; Garrity, 2003). Contudo, todos os membros compartilham um conjunto de genes envolvidos na esporulação, provavelmente herdado de um ancestral comum a todas as linhagens do filo *Firmicutes*. Desta forma, a habilidade de formar esporos foi perdida por algumas linhagens ao longo da evolução, sugerindo que a sobrevivência ambiental por produção de um esporo viável tem um custo elevado.

Ferdinand Cohn foi o primeiro a descrever o processo de endoesporulação (deste ponto referido como esporulação) e iniciou a mudança da nomenclatura de algumas espécies, como é o caso do *Vibrio subtilis*, que passou a se chamar *Bacillus subtilis*, em 1872 (*apud* Verbaendert e de Vos, 2011), e se tornou desde então o paradigma da esporulação. A partir daí, outras espécies, tais como o *B. anthracis*, foram alocadas no novo gênero *Bacillus* (Galperin, 2013; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004).

Inicialmente, a única característica utilizada para agrupar espécies no gênero *Bacillus* era a morfologia celular, ou seja, a forma em bastão (Galperin, 2013; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Todavia, a partir do desenvolvimento de métodos mais eficientes de isolamento, da compreensão das necessidades nutricionais e do desenvolvimento e aprimoramento de

métodos de identificação e classificação foi possível nomear e classificar os microrganismos de maneira mais adequada e, conseqüentemente, alocá-los em *taxa* apropriados (Fritze, 2004).

Atualmente, as Bactérias aeróbias formadoras de endósporo estão distribuídas em mais de 25 famílias e de 200 gêneros dentro do filo *Firmicutes*.

1.2. Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

Bactérias aeróbias formadoras de endósporo (deste ponto em diante, referidas como Bafes) são ubíquas e representam a maior parte da microbiota em muitos ambientes naturais (Hong *et al.*, 2009; Reva *et al.*, 2001). Apesar disto, o conhecimento sobre a Biologia deste grupo de microrganismos é extrapolado a partir de estudos abordando apenas espécies individuais, como *B. subtilis* e linhagens do grupo do *B. cereus* (Logan e de Vos, 2011).

O método eleito para o isolamento de Bafes ainda é a seleção térmica de esporos, após a destruição de células vegetativas de linhagens não termófilas (Logan e de Vos, 2011). Em condições físico-químicas apropriadas, os esporos viáveis germinam e a célula resultante se divide por fissão binária. Em geral, esses organismos são de fácil cultivo e atingem altas taxas de crescimento.

Apenas um pequeno número de espécies de Bafes são oportunistas ou patógenos obrigatórios de animais (Logan e de Vos, 2011; Gardener, 2004). Acredita-se que o solo seja o principal reservatório desses organismos, onde desempenham importante papel, pois o hábito saprófita da maioria das linhagens sugere um papel nas ciclagens de C e N (Mandic-Mulec e Prosser, 2011).

1.2.1. Importância tecnológica

Muitas espécies de Bafes apresentam alto potencial biotecnológico, incluindo as áreas médica e agrícola. Por exemplo, o biocontrole de pragas de plantas, notadamente de insetos, por produtos à base de *B. thuringiensis*, uma espécie que produz um cristal parasporal tóxico para diversos invertebrados (Van der Auwera *et al.*, 2013; Ohba, 2009; Jensen *et al.*, 2003; Schnepf, 1998). Da mesma forma, as espécies *Paenibacillus lentimorbus* e *P. popilliae* possuem atividade larvicida contra besouros pragas de gramíneas (de Vos *et al.*, 2009). Além de invertebrados, fungos associados a plantas também podem ser combatidos por espécies de Bafes. Algumas linhagens de *Bacillus*, tais como, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis* têm sido comercializadas para o controle de fungos oriundos de solo, tais como, espécies dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, dentre outros, que afetam plantações e mudas de árvores (Pérez-García *et al.*, 2011).

A biorremediação de solo também tem sido explorada utilizando espécies de Bafes, tais como linhagens do gênero *Brevibacillus*, capazes de neutralizar metais tóxicos (Ruiz-Lozano e Azcón, 2011). Em adição é possível citar as *Geobacillus spp*, que têm sido isoladas de poços de petróleo e são capazes de degradar hidrocarbonetos (Banat e Marchant, 2011). Devido a essa característica, o potencial destas para remediação de contaminação de solos por óleos está sendo investigado.

1.2.2. Danos causados por Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

A despeito dos inúmeros benefícios relacionados às Bafes, algumas linhagens podem representar um problema industrial, como no caso do *B. cereus*, agente causador de intoxicação alimentar, constantemente encontrado em produtos alimentícios industrializados ou *in natura* (Van der Auwera *et al.*, 2007). Outra espécie considerada risco para a saúde pública e biodefesa é o *B. anthracis*, agente causador do antraz e utilizado como arma biológica (Mertens *et al.*, 2014; Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003).

Frente a toda a diversidade descrita, a Biologia de Bafes ainda é pouco estudada e o potencial biotecnológico pouco explorado. Portanto, investigações que contribuam para o conhecimento básico dessas espécies são essenciais para o desenvolvimento de produtos à base dessas linhagens.

1.3. Esporulação

A diferenciação celular é um processo biológico que envolve a coordenação e o estabelecimento de programas distintos de expressão gênica, além de mudanças morfológicas nos diferentes tipos celulares envolvidos (Hilbert e Piggot, 2004; Driks, 1999). A esporulação, ou formação de esporos, em *B. subtilis* é um sistema primitivo de diferenciação celular e tornou-se o paradigma para o estudo deste processo em procariotos. A metamorfose de células vegetativas em células dormentes ocorre dentro do esporângio que é composto por dois compartimentos (Driks, 1999; Cutting *et al.*, 1990). O compartimento maior, denominado célula mãe e o compartimento menor, pré-esporo (Piggot e Hilbert, 2004; Phillips e Strauch, 2002; Driks, 1999).

O esporo maduro resultante do processo de diferenciação é composto por um conjunto de estruturas de proteção arranjadas em camadas concêntricas. Em conjunto com componentes do citoplasma, ou núcleo do esporo, cada um desses componentes contribui para a resistência do esporo, que pode ser viável por milhões de anos (Moeller *et al.*, 2014; La Duc *et al.*, 2004; Driks, 2003; Vreeland *et al.*, 2000; Cano e Borucki, 1995). Um estudo de 1995

relatou a recuperação de esporos viáveis de *B. sphaericus* (atualmente denominado *Lysinibacillus sphaericus* — Ahmed *et al.*, 2007) do trato gastrointestinal de fósseis, preservados em âmbar, de uma espécie de abelha já extinta (Cano e Borucki, 1995). A idade desses esporos foi estimada entre 25 e 40 milhões de anos. Em 2000, Vreeland e cols. divulgaram o isolamento de esporos de *Bacillus spp.* de amostras de cristais de NaCl do período Permiano, datadas com mais de 250 milhões de anos. Essas descobertas corroboram a extrema resistência desses esporos.

Diferentemente de outras células dormentes devotadas à reprodução e metabolicamente ativas, as propriedades fisiológicas dos esporos de linhagens do filo *Firmicutes* são extremamente diferentes (Moeller *et al.*, 2014; Setlow, 2007; Hilbert e Piggot, 2004; La Duc *et al.*, 2004). A função da dormência de esporos bacterianos descritos neste trabalho é garantir a sobrevivência em condições inadequadas para a viabilidade de células vegetativas. Mesmo na presença de umidade, os esporos dessas linhagens não apresentam metabolismo detectável e podem sobreviver a diferentes tratamentos físicos e químicos que inviabilizariam rapidamente uma bactéria em fase vegetativa (Setlow, 2007). Dentre esses tratamentos, podem ser citados calor seco e úmido, radiação γ e ultra violeta (UV), dessecação e compostos químicos altamente tóxicos, como por exemplo, peróxido de hidrogênio (Moeller *et al.*, 2014; Setlow, 2007; Hilbert e Piggot, 2004; La Duc *et al.*, 2004).

A formação de um esporo pode ser dividida, didaticamente, em sete estágios morfológicos, intimamente associados às mudanças na expressão gênica (Setlow, 2007; Hilbert e Piggot, 2004; Driks, 1999). Os principais eventos morfológicos, bioquímicos e da regulação da expressão gênica que ocorrem durante cada estágio da esporulação estão resumidos abaixo e na figura 1:

- **Estágio 0** — Célula em estado vegetativo, com genoma duplicado;
- **Estágio I** — Formação de um filamento axial, onde as duas cópias do genoma se condensam e alongam para formar um filamento distribuído ao longo do eixo celular;
- **Estágio II** — Formação do septo assimétrico que divide a célula em diferenciação (esporângio) em dois compartimentos, o menor (pré-esporo) e o maior (célula mãe);
- **Estágio III** — Engolfamento do pré-esporo;
- **Estágio IV** — Síntese do córtex: deposição de camadas de peptidoglicano, ligadas frouxamente, no espaço entre as membranas que envolvem o núcleo do pré-esporo;
- **Estágio V** — Formação da capa;
- **Estágio VI** — Maturação do esporo;
- **Estágio VII** — Lise da célula mãe e liberação do esporo maduro.

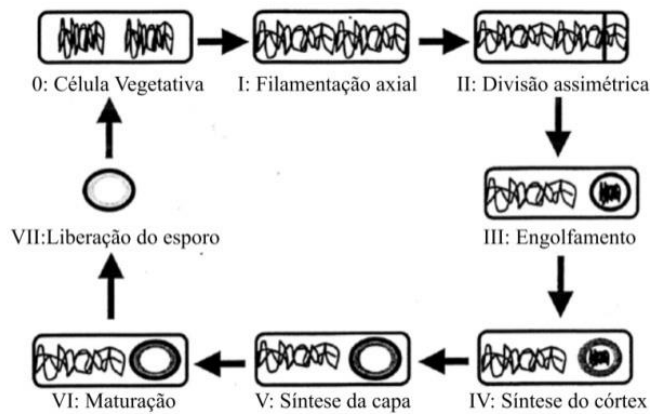


Figura 1. Representação dos estágios da esporulação.

As principais características morfológicas e bioquímicas em cada estágio estão indicadas abaixo da representação gráfica da evolução do processo. Adaptado de Hilbert e Piggot, 2004.

A esporulação foi caracterizada primeiramente em *B. subtilis* essa espécie permanece como principal modelo do processo (Hilbert e Piggot, 2004). Entretanto, os mesmos fatores chave de regulação ativos em *B. subtilis* foram identificados em diversas outras espécies formadoras de endósporos, com genomas inteiramente sequenciados, inclusive *B. anthracis* e *Clostridium difficile*. As conclusões obtidas a partir de estudos com *B. subtilis* são geralmente válidas para os membros da família *Bacillaceae*, além de outras, e representam as características gerais de diferenciação celular.

A decisão em esporular é uma resposta de *quorum sensing*. Em conjunto com alta densidade celular e moléculas sinalizadoras, a esporulação é disparada por sinais ambientais, principalmente, baixas concentrações de C, N ou P, em algumas circunstâncias (Setlow, 2007; Baràk *et al.*, 2005; Hilbert e Piggot, 2004; Grossman e Losick, 1988). Os sinais metabólicos e ambientais percebidos por *B. subtilis*, e outras Bafes, são integrados a um sistema de transferência sequencial de fosfato, denominada cascata de fosforilação.

Portanto, as bactérias capazes de esporular possuem vias complexas de transdução de sinal que monitoram e respondem rapidamente aos sinais ambientais (Baràk *et al.*, 2005). A esporulação é iniciada após a ativação da cascata de fosforilação de Spo0A, o principal fator transcricional que regula a expressão gênica na transição da fase logarítmica para a fase estacionária, que corresponde ao momento do ciclo celular onde o esporo é formado (Piggot e Hilbert, 2004; Fujita e Losick, 2003). A ativação ou repressão da expressão de mais de 500 genes é dependente de Spo0A, sendo que 121 estão sob controle direto de um dímero da

proteína fosforilada (Spo0A-P) ou seja, a forma ativa (Baràk *et al.*, 2005; Piggot e Hilbert, 2004). A ativação de Spo0A passa por diversas fases (Piggot e Hilbert, 2004) e somente células que atingem um nível mínimo de Spo0A-P iniciam o processo de diferenciação celular (Baràk *et al.*, 2005). Durante a esporulação, Spo0A-P pode ativar a transcrição a partir de promotores controlados por dois fatores sigma, σ^A e σ^H (Hilbert e Piggot, 2004; Fujita e Losick, 2003; Driks, 1999; Haldenwang, 1995). Assim, Spo0A-P age em conjunto com a RNA polimerase associada ao principal fator σ de fase vegetativa (σ^A), ou ao σ^H , que em conjunto com σ^A , dirige a transição da fase logarítmica para a estacionária.

Antes da diferenciação ser disparada, o genoma do esporângio é duplicado (Hilbert e Piggot, 2004; Fujita e Losick, 2003; Driks, 1999 — Figura 1). Em seguida, um mecanismo particular de divisão cromossomal garante que as regiões de origens de replicação (*oriC*) das duas cópias de cromossomos sejam arrastados para os polos da célula produzindo uma estrutura alongada denominada filamento axial que aumenta o comprimento do esporângio, em relação à célula vegetativa (Baràk *et al.*, 2005 — Figura 1). A formação do filamento axial requer, dentre outras, as proteínas DivIVA e RacA. A proteína RacA (Remodelamento e ancoragem do cromossomo A) se liga às origens de replicação dos cromossomos e a ambos os polos da célula onde estão localizadas as proteínas DivIVA (Hilbert e Piggot, 2004). Assim, a RacA age como uma ponte ligando os cromossomos às extremidades da célula.

Uma vez formado o filamento axial, o próximo passo na esporulação é a divisão assimétrica (Hilbert e Piggot, 2004; Driks, 1999). Em fase vegetativa, a proteína FtsZ, homóloga de tubulina, forma um anel onde o septo simétrico será formado, após os cromossomos terem migrado para as células filhas (Hilbert e Piggot, 2004; Grauman e Losick, 2001). Contrariamente, durante a formação do esporo, o anel FtsZ é formado em ambos os polos da célula e antes da segregação das duas cópias do genoma (Hilbert e Piggot, 2004; Grauman e Losick, 2001). Apesar do anel FtsZ ser formado em ambos os polos da célula, outra proteína necessária para a completa montagem do anel — FtsA — está localizada somente em um polo, indicando que esta proteína pode ter papel na seleção do polo onde a formação do septo irá ocorrer (Hilbert e Piggot, 2004). Após a formação do septo, o processo de esporulação torna-se irreversível.

Quando a divisão assimétrica está concluída, apenas um terço do genoma está no compartimento do pré-esporo (Grauman e Losick, 2001). O restante é arrastado para o compartimento menor pela translocase SpoIIIE, localizada no próprio septo.

Imediatamente após a formação do septo, dois programas de expressão gênica — diferentes, mas interdependentes — são iniciados, primeiramente nos compartimentos do pré-esporo e em

seguida da célula mãe, mediados pelos fatores σ^F e σ^E , respectivamente (McKenney *et al.*, 2013; Bàrak *et al.*, 2005; Hilbert e Piggot, 2004). Esses fatores de transcrição, exclusivos de fase estacionária, regulam a expressão de genes que promovem o engolfamento do pré-esporo (Figura 1) e a deposição de uma camada de peptidoglicano entre as membranas interna e externa do pré-esporo, o que resulta na formação do córtex (Setlow, 2007; Driks, 1999). A partir desse momento, pequenas proteínas ácido-solúveis e dipicolinato de cálcio são depositados no núcleo do esporo causando a acidificação dessa região e a diminuição do conteúdo de água, respectivamente, o que contribui para inativar o metabolismo do esporo (Setlow, 2007). Nos estágios finais da esporulação, camadas proteicas complexas, em conjunto, denominadas capa do esporo (Figura 1), são depositadas sobre o córtex (Setlow, 2007). A capa funciona como uma barreira para a entrada de grandes moléculas tóxicas, como por exemplo a lisozima, e tem papel fundamental na germinação (Driks, 2003). Eventualmente, algumas espécies podem apresentar uma camada adicional denominada exósporo, cuja função ainda não foi completamente caracterizada, mas pode estar associada à germinação e adesão dos esporos a algumas superfícies (McKenney *et al.*, 2013; Driks, 2003). Entretanto, o exósporo não uma estrutura é essencial para o esporo, uma vez a estrutura não é observada em todas as espécies, incluindo o paradigma da esporulação, *B. subtilis*. Recentemente, uma camada mais externa à estrutura canônica da capa do esporo de *B. subtilis* foi descrita e designada crosta por McKenzie e cols. (2010). As ultraestruturas de esporos de espécies modelos estão ilustradas na figura 2.

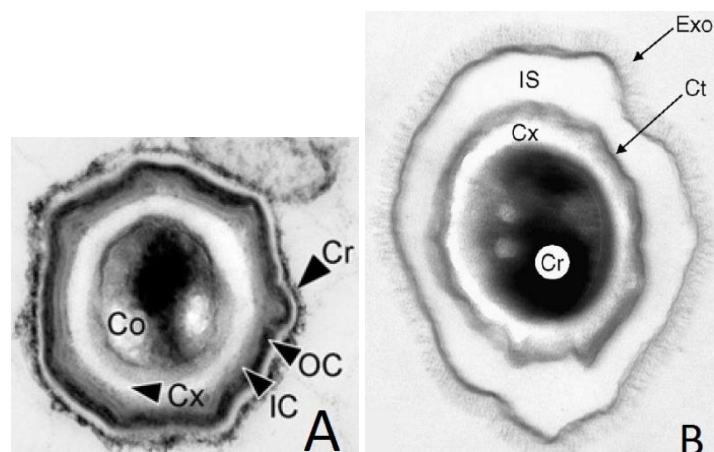


Figura 2. Ultraestrutura de esporos. (A) Micrografia de esporo de *B. subtilis*: cerne (Co); córtex (Cx); capa interna (IC); capa externa (OC); crosta (Cr). Adaptado de McKenzie *et al.*, 2010. (B) Micrografia de esporo de *B. anthracis*: (Cr), núcleo; (Cx), córtex; (Ct), capa; (IS), espaço entre a capa e o exósporo; (Exo), exósporo. Adaptado de Driks, 2009.

O esporo resultante desse processo é uma estrutura altamente refratável e vista com um brilho destacado ao microscópio de contraste de fase, como pode ser observado na figura 3 (de Vos *et al.*, 2009; Hilbert e Piggot, 2004). Os tipos morfológicos de esféricos a ovalados, bem como a localização — central, subterminal, terminal ou lateral — e a observação de deformação ou não do esporângio durante a formação do esporo, são utilizados como parâmetros de classificação.

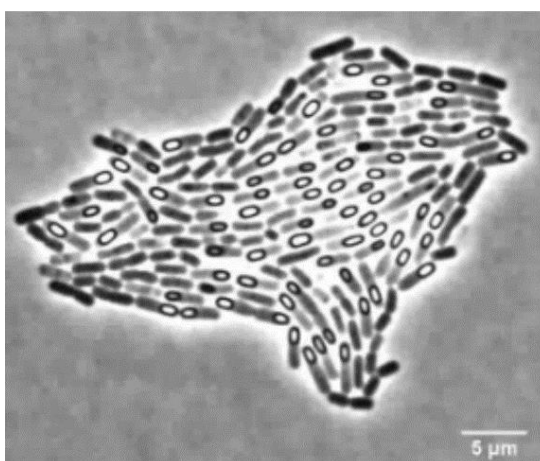


Figura 3. Células de *B. subtilis* em esporulação. Células em estágios avançados da esporulação observadas por microscopia de contraste de fase, onde é possível visualizar os esporos ovalados em formação com o brilho característico dentro dos esporângios. Adaptado de Eijlander *et al.*, 2014.

1.4. Taxonomia de Bafes

Dentro do filo *Firmicutes*, as Bafes estão alocadas principalmente na classe *Bacilli*. Dentro dessa classe, a ordem *Bacillales* é constituída por nove famílias, das quais, sete incluem gêneros de Bafes: *Bacillaceae*, *Alycibacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae* e *Thermoactinomycetaceae* (Logan e Halket, 2011). Em razão de abrigarem o maior número de espécies, as principais características das famílias *Bacillaceae* e *Paenibacillaceae*, serão detalhadas a seguir, com ênfase nos gêneros com maior número de espécies conhecidas.

1.4.1. Família *Bacillaceae*

A família *Bacillaceae* abriga espécies de gêneros aeróbios ou facultativos de formadores de esporos que eram, até os anos 1990, acomodados erroneamente no gênero

Bacillus (Verbaendert e de Vos, 2011). A característica mais proeminente da família é a formação de esporos. Os gêneros mais caracterizados serão descritos a seguir.

1.4.1.1. Gênero *Bacillus*

Dentro da família *Bacillaceae*, o gênero *Bacillus* acomoda o maior número de espécies de Bafes conhecidas — pelo menos 153 — e melhor estudadas, sendo o *B. subtilis* a espécie tipo do gênero (Logan e Halket, 2011). Segundo o Manual de Bergey's Firmicutes (de Vos *et al.*, 2009), esse gênero compreende células em forma de bastão, retas ou curvadas, que podem estar isoladas, em pares ou filamentos de tamanhos variados e a maioria das espécies é aeróbia. A ligação cruzada mais comumente encontrada na PC envolve resíduos de ácido meso-diaminopimélico (*meso*-DAP) na terceira posição (Figura 4). Esses organismos podem apresentar motilidade por flagelos peritríquios, ou podem ser imóveis. Em geral, são quimio-organotróficos e, em laboratório, crescem em meios de cultura utilizados rotineiramente. São isolados principalmente do solo. A morfologia e o tamanho das colônias variam entre as espécies. Os esporos altamente resistentes fazem dos organismos pertencentes a esse gênero possíveis contaminantes, principalmente, na indústria alimentícia. A maioria das espécies não apresenta potencial patogênico, com poucas exceções, como o *B. anthracis* (patogênico para humanos e outros animais), o *B. thuringiensis* (patogênico para invertebrados) e o *B. cereus* que pode causar intoxicação alimentar e outras infecções em humanos.

1.4.1.1.1. Grupo do *B. cereus*

O grupo do *B. cereus sensu lato* é um *cluster* homogêneo, ou seja, composto por espécies altamente relacionadas taxonomicamente (Guinebretière *et al.*, 2012; Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003). Este grupo é composto pelas espécies *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*. Recentemente, o *B. cytotoxicus* (Guinebretière *et al.*, 2012) e o *B. toyonensis* (Jiménez *et al.*, 2013) foram propostos como as sétima e oitava espécies do grupo, respectivamente. Curiosamente, o *B. toyonensis* foi descrito primariamente como uma subespécie do *B. cereus sensu stricto* e é utilizado como probiótico (Kozasa *et al.*, 1977). Porém, novos dados oriundos de estudos taxonômicos polifásicos levaram à proposição da nova espécie (Jiménez *et al.*, 2013).

B. cereus sensu stricto é associado à intoxicação alimentar, podendo se manifestar de duas formas distintas: diarreia e dor abdominal ou náusea e vômito. Essa espécie está presente em muitos produtos alimentícios e, por esta razão, é ingerida em pequenas quantidades, contribuindo para a microbiota intestinal transitória (Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003).

Além da intoxicação alimentar, casos de periodontite e oftalmite também foram associados a essa espécie (Van der Auwera *et al.*, 2007). Essas linhagens isoladas de casos clínicos são consideradas agentes biológicos de classe de risco 2. De modo interessante, algumas linhagens de *B. cereus sensu stricto* são utilizadas como probióticos e, por serem consideradas seguras para o emprego médico, são consideradas classe 1 (Hong *et al.*, 2005).

O *B. anthracis* é o agente causador do antraz e a virulência está associada à presença dos plasmídeos pXO1 e pXO2 que codificam os fatores tóxicos (toxina tripartida) e a, pouco usual, cápsula de ácido D-glutâmico, respectivamente (Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003). Por isso, não é surpreendente que a perda de pXO2 resulta em um mutante incapaz de estabelecer infecção. Segundo a classificação de risco, linhagens de *B. anthracis* são da classe 3 e devem ser manipuladas em ambiente de contenção nível 3 (NB-3).

O *B. thuringiensis*, considerado NB-1, produz cristais parasporais constituídos de proteínas Cry ou Cyt, utilizadas por mais de 60 anos como controle de insetos de diversas ordens e outros invertebrados (Sansinenea e Ortiz, 2011; Joung e Côté, 2001; Schnepf, 1998). Recentemente, foi descrita uma nova família de proteínas Cry, denominadas parasporinas, que possuem toxicidade específica para células cancerígenas de diversas origens (Ohba *et al.*, 2009).

As espécies *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*, frequentemente, apresentam crescimento do tipo rizoide (Tourasse *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2003). Alguns isolados apresentaram atividade contra espécies fúngicas ou inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Apesar de ser um grupo de bactérias mesófilas, o grupo do *B. cereus* ainda inclui o *B. weihenstephanensis*, um membro psicrotolerante ainda pouco caracterizado (Tourasse *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2003), e a espécie *B. cytotoxicus*, isolada pela primeira vez na França (1998) a partir de um surto de intoxicação alimentar (Guinebretière *et al.*, 2012). Essa última espécie é termotolerante e produz uma enterotoxina denominada citotoxina K.

Apesar de ser um dos grupos de bactérias mais estudados, a filogenia do grupo do *B. cereus* ainda é alvo de grande debate (Maughan e Van der Auwera, 2011; Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003). Acredita-se que as diferentes linhagens possam ser ecotipos e patotipos originados de um ancestral comum, cujo genoma passou por uma série de rearranjos mediados por elementos móveis de DNA (transposons, sequências de inserção e fagos), em sinergia com diversos mecanismos de transferência horizontal de genes.

1.4.1.1.2. Grupo do *B. subtilis*

O grupo do *B. subtilis sensu lato* compreende as espécies: *B. subtilis sensu stricto*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* e *B.*

sonorensis (Wang *et al.*, 2007). Assim como no grupo do *B. cereus*, as espécies do grupo são estreitamente relacionadas, não sendo possível fazer a distinção entre as linhagens baseando-se somente em análises de sequências de rDNA/rRNA 16S (de Vos *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Wattiau *et al.*, 2001).

As espécies desse grupo não são patogênicas e apresentam grande potencial biotecnológico (Streshinskaya *et al.*, 2011). As principais aplicações na indústria são a produção de enzimas (proteases, amilases e celulasas, dentre outras hidrolases), antibióticos, fermentação de alimentos, vitaminas (Jeyaram *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007) etc. A espécie *B. subtilis sensu stricto* participa da formação de biofilme que previne infecções causadas por patógenos de plantas (Park *et al.*, 2009) e também é explorada como fator de crescimento vegetal (Lugtenberg e Kamilova, 2009; Kloepper *et al.*, 2004).

1.4.1.2. Gênero *Lysinibacillus*

Até 2007, as espécies desse gênero eram alocadas dentro do gênero *Bacillus*, quando Ahmed e cols. propuseram a criação do novo *taxon*. A principal característica que distingue as espécies do gênero *Lysinibacillus* de outras Bafes é a presença de lisina, como terceiro resíduo de aminoácido no peptideoglicano da PC, conforme ilustrado na figura 4 (Nam *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2007). Comumente, o aminoácido de terceira posição da PC é o meso-DAP, como já mencionado (Fig. 4).

No artigo de proposição do novo gênero (Ahmed *et al.*, 2007), os autores descrevem a morfologia celular dos organismos em forma de bastão e os esporos, com morfologia esférica ou elíptica com posição terminal e que deformam o esporângio. Podem apresentar motilidade. A espécie tipo do gênero é *L. boronitolerans*.

1.4.1.3. Gênero *Geobacillus*

A maioria dos termófilos alocados no gênero *Bacillus* foi transferida para o gênero *Geobacillus*, que tem como espécie tipo o *G. stearothermophilus* (Logan e Halket, 2011). Linhagens desse gênero apresentam crescimento em faixa de temperatura de 35 °C a 75 °C, mas o crescimento ótimo se dá entre 55 °C e 65 °C (de Vos *et al.*, 2009). A maioria das espécies não necessita de fatores de crescimento, Na, K e vitaminas e utilizam n-alcanos como fonte de C e energia.

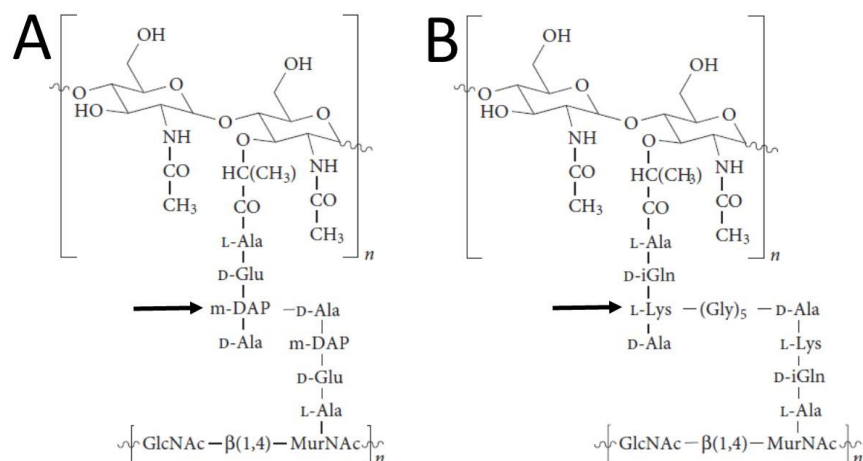


Figura 4. Estruturas de peptidoglicano. O peptidoglicano é um polímero de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) ligados por uma ligação β -1,4 e com uma cadeia peptídica ligada aos resíduos de MurNAc. As cadeias peptídicas adjacentes são unidas por uma ligação cruzada direta ou indireta, mediada por uma ponte de pequenos peptídeos. A terceira posição de aminoácido está indicada por setas. **(A)** Estrutura de PG com meso-DAP, típica de gênero *Bacillus*. **(B)** Estrutura de PG com lisina (Lys), típica do gênero *Lysinibacillus*. Adaptado de Royet e Dziarski, 2007.

1.4.2. Família *Paenibacillaceae*

Na família *Paenibacillaceae*, o gênero *Paenibacillus*, com o segundo maior número de espécies de Bafes — 110 espécies descritas — é o segundo que contém o maior número de espécies conhecidas, sendo o segundo maior gênero que aloca espécies de Bafes (Logan e Halket, 2011; de Vos *et al.*, 2009). Uma das principais características fenotípicas dos organismos descritos nesta família é o esporo oval, ou elipsoidal, que frequentemente deforma o esporângio (de Vos *et al.*, 2009).

1.4.2.1. Gênero *Paenibacillus*

No manual de Bergey's Firmicutes (de Vos *et al.*, 2009), as espécies alocadas no gênero *Paenibacillus* são descritas como organismos em forma de bastão Gram positivos, mas que quase sempre respondem como Gram negativos sendo, portanto, Gram variáveis. Os esporos geralmente têm diâmetro maior que a largura do esporângio, resultando na deformação da célula em desenvolvimento. Quando há motilidade, esta ocorre por flagelos peritríquios.

As colônias formadas são geralmente pequenas, translúcidas e sem pigmento na maioria das espécies (de Vos *et al.*, 2009). Quando as condições de crescimento são sub-ótimas — por exemplo, pouco nutriente ou concentrações sub-toxicas de antibióticos — o padrão das

colônias pode ser quiral ou em vórtices. A maioria dos organismos cresce em ágar nutriente e pH neutro, mas fontes de C fermentáveis aumentam a taxa de crescimento. Uma característica notável de organismos deste gênero é a capacidade de hidrolisar carboidratos complexos, dentre estes, carboximetil celulose, quitina, xilano e amido.

Ainda não foram descritas espécies patogênicas para humanos e outros mamíferos, mas algumas espécies podem provocar septicemia em insetos (de Vos *et al.*, 2009). O ambiente onde estas linhagens são mais comumente encontrados é o solo, principalmente aqueles ricos em húmus e material vegetal, hidrolisáveis por exoenzimas, que processam carboidratos. A espécie tipo é *P. polymyxa*.

1.5. Plasmídeos de Bafes

A transferência gênica horizontal (TGH) é a forma mais simples de disponibilizar um repertório de genes e, conseqüentemente, aumentar a diversidade genética de populações procarióticas (Polz *et al.*, 2013; Llosa e de la Cruz, 2005; Hu e Mahillon, 2004). A TGH é mediada por transdução, transformação ou conjugação. Dentre estes, a conjugação é o evento de transferência gênica mais efetivo e disseminado e, provavelmente, o que mais contribui para a diversidade genética no mundo procariótico (Baltrus, 2014; Wegrzyn, 2005; Llosa e de La Cruz, 2005). Tal diversidade é resultante, dentre outros eventos, da propagação de genes de virulência e resistência a antimicrobianos.

A conjugação é um processo biológico altamente específico e requer a fusão de envelopes das células envolvidas. Durante este evento, mediado estritamente pela expressão de informação plasmidial, o DNA é transferido de uma célula doadora para uma receptora com auxílio de um complexo multiproteico, denominado aparato de conjugação (Llosa e de La Cruz, 2005; Grohmann *et al.*, 2003). A habilidade em disseminar informação genética por conjugação também inclui a transferência de informação cromossomal e de outros elementos extra cromossomais não conjugativos (Baltrus, 2014).

O termo plasmídeo foi introduzido por Joshua Lederberg (1952) e hoje é definido como uma partícula genética extra cromossomal de replicação autônoma (Wegrzyn, 2005; Funnel e Phillips, 2004; Thomas, 2000). Outra característica relevante destes elementos refere-se ao conteúdo de informações relacionadas à virulência, degradação de compostos tóxicos e resistência a antibióticos e metais pesados (Rosso e Vary, 2005). Portanto, os plasmídeos são elementos genéticos que promovem a variedade e, conseqüentemente, a adaptação das espécies portadoras (Thomas, 2000). Assim, o conhecimento amplo sobre o perfil plasmidial das linhagens de Bafes é importante para iniciar a investigação sobre a real contribuição desses

elementos genéticos para a Biologia do grupo (Van der Auwera *et al.*, 2013; Papazisi *et al.*, 2011; Kølsto *et al.*, 2009; Andrup *et al.*, 2008; Rasko *et al.*, 2007; Reyes-Ramírez e Ibarra, 2007; Schnepf *et al.*, 1998).

Plasmídeos bacterianos regulam a frequência de iniciação da própria replicação, de modo que, em um hospedeiro em particular e sob condições específicas de crescimento, estão presentes em um número definido de cópias, que pode variar, significativamente — de uma a centenas —, dentre os diferentes plasmídeos (Praszkier e Pittard, 2005; Schnepf *et al.*, 1998). Como os plasmídeos são incapazes de replicar fora do hospedeiro, sendo portanto parasitas obrigatórios, estes elementos estão sob pressão seletiva constante. A pressão de seleção é necessária para minimizar efeitos deletérios que a presença desses elementos possa causar na habilidade da célula hospedeira em competir com outras não portadoras de plasmídeos (Silva *et al.*, 2011; Bouma e Lenski, 1988).

Os plasmídeos apresentam papel importante na Biologia de espécies de *Bacillus* e outras Bafes. Em conjunto com elementos móveis, tais como bacteriófagos e transposons, esses elementos permitem alta eficiência de TGH entre essas linhagens, fomentando a diversidade genética no grupo (Van der Auwera *et al.*, 2013; Papazisi *et al.*, 2011; Kølsto *et al.*, 2009; Rasko *et al.*, 2007; Reyes-Ramírez e Ibarra, 2007; Schnepf *et al.*, 1998).

Esses elementos podem constituir quantidade substancial do genoma bacteriano, no caso do *B. thuringiensis*, podendo representar até 20% do genoma total (Schnepf *et al.*, 1998). A maioria das linhagens do grupo do *B. cereus* carrega plasmídeos em números variáveis, mais comumente de 1 a 12, com tamanho variando de 2 a 600 kb, muitos destes conjugativos e portadores de elementos móveis diversos (Kølsto *et al.*, 2009; Andrup *et al.*, 2008; Reyes-Ramírez e Ibarra, 2007; Lereclus *et al.*, 1982). O número e o tamanho sugerem que esses plasmídeos constituem um grande reservatório de novos genes, contribuindo para o *fitness* das espécies em uma grande variedade de nichos (Papazisi *et al.*, 2011; Kølsto *et al.*, 2009; Schnepf *et al.*, 1998).

É importante ressaltar que a maioria das características fenotípicas que distinguem espécies dentro do grupo do *B. cereus* é codificada por plasmídeos. Apesar da maioria desses elementos permanecer críptica, diversos fenótipos e propriedades específicas para os ecotipos e patotipos de Bafes, notadamente no caso do grupo do *B. cereus*, são diretamente relacionados à presença ou ausência de plasmídeos portadores destas informações, muitos desses conjugativos (Van der Auwera e Mahillon, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003; Schnepf *et al.*, 1998). As três espécies comprovadamente patogênicas do grupo — *B. anthracis*, *B. thuringiensis* e *B. cereus* — apresentam a maioria dos genes de virulência

localizada em plasmídeos (Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013; Van der Auwera e Mahillon, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003; Wilcks *et al.*, 1998). Em *B. anthracis*, a patogenicidade é mediada pela presença dos plasmídeos pXO1 (182 kb) e pXO2 (96 kb) que codificam as toxinas e a cápsula, respectivamente (Kølsto *et al.*, 2007; Van der Auwera *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003). Em *B. thuringiensis*, os genes *cry*, codificadores das proteínas Cry presentes no cristal parasporal, estão localizados em plasmídeos de pelo menos 30 kb (Kølsto *et al.*, 2009; Villas-Bôas *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003; Schnepf *et al.*, 1998).

Em *B. cereus*, as fosfolipases e enterotoxinas são fatores de virulência codificados por genes cromossomais, porém a produção de cereulídeo — que causa a síndrome emética — é codificada por um grande plasmídeo (200 kb) de virulência denominado pCERE01 (Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013; Van der Auwera *et al.*, 2007).

Diversas evidências que apontam para a ocorrência de TGH entre as espécies no grupo do *B. cereus* (Maughan e Van der Auwera, 2011; Van der Auwera *et al.*, 2007). Por exemplo, casos graves de infecção pulmonar, semelhantes a infecções causadas por *B. anthracis*, na realidade foram causados por *B. cereus*. As linhagens de *B. cereus* responsáveis por essas infecções portavam um plasmídeo contendo 99,6% de identidade com o plasmídeo pXO1 de *B. anthracis* (Hoffmaster *et al.*, 2004). Essas linhagens também apresentavam um outro plasmídeo que codifica atividades envolvidas na via de produção de cápsula polissacarídica, ao contrário da cápsula típica de *B. anthracis*, composta de ácido glutâmico.

Como mencionado anteriormente a espécie *B. thuringiensis* é classificada como NB-1, porém em 1998, Hernandez e cols., relataram um caso de superinfecção em humanos causada por *B. thuringiensis* subsp. *konkukian*, portador de um plasmídeo altamente relacionado ao pXO2 de *B. anthracis*, mas desprovido dos genes que codificam a via de produção de cápsula. Essa alta similaridade também foi observada no plasmídeo pAW63 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que foi bastante estudado em razão das propriedades conjugativas (Van der Auwera e Mahillon, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que, as informações plasmidiais de virulência encontradas em linhagens do grupo do *B. cereus* podem ser encontradas em outras espécies alocadas dentro e fora do gênero *Bacillus* (Feldgarden *et al.*, 2013; Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013; Rasimus *et al.*, 2012; Fritze, 2004; Phelps e McKillip, 2002).

Estas e outras descobertas levantam a questão de quão adequadas e seguras são as distinções utilizadas para definir as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* (Maughan e Van der Auwera, 2011; Rasko *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003), por exemplo.

Esses organismos compartilham um conteúdo genético associado à virulência, que não pode ser delimitado pelas limitações das classificações tradicionais de espécies.

1.6. Estudos filogenéticos

Sempre que a presença, atividade ou interação com microrganismos são investigadas em amostras ambientais ou clínicas, a subsequente identificação do respectivo *taxon* é obrigatória (Ludwig, 2007). Portanto, a sistemática tem papel central em qualquer área da Microbiologia. A sistemática, tanto de procariotos, quanto de eucariotos, teve início com a observação de que os organismos vivos poderiam ser agrupados por similaridades (Cohan, 2006). Tais grupos eram originalmente demarcados apenas com base nas características fenotípicas dos indivíduos.

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas nas análises filogenéticas, graças, principalmente, ao constante aprimoramento e a relativa simplicidade na execução que estas apresentam (Buso, 2005). A maior vantagem dos métodos moleculares é a investigação direta da situação genotípica, permitindo a detecção de variação ao nível de DNA, excluindo as influências ambientais.

Filogenia molecular é o estudo das relações evolutivas entre organismos, genes ou proteínas combinando a Biologia Molecular com técnicas estatísticas (Polanski e Kimmel, 2007). Os diferentes métodos utilizados para identificar os membros distintos de uma comunidade podem ser utilizados para a realização de estudos filogenéticos. Por exemplo, quando se trata de uma família de sequências — de genes ou proteínas — a análise filogenética determina quanto a família pode ter derivado durante a evolução (Mount, 2004). As relações evolutivas são plotadas em um gráfico bidimensional denominado árvore evolutiva (Dagan, 2011; Polanski e Kimmel, 2007; Mount, 2004).

Hoje a sistemática, incluindo a bacteriana, dispõe de diversos métodos para distinguir espécies, tais como, a análise de sequências conservadas de ácidos nucleicos ou proteínas, respectivamente, por filogenia ou filoproteômica, tal como, a espectrometria de massa por MALDI-TOF (Polanski e Kimmel, 2007; Dagan, 2011) .

1.6.1. Árvores filogenéticas

A árvore filogenética é composta por nós mais externos — ou folhas — nós e galhos, que representam os *taxa* e as relações entre esses (Mount, 2004), como ilustrado na figura 5. Os nós em árvores filogenéticas são chamados de unidades taxonômicas (TU; do inglês, *taxonomic units*) e, geralmente, são representados por sequências de ácidos nucleicos ou

aminoácidos (Polanski e Kimmel, 2007). Os galhos de uma árvore indicam relações de ancestralidade ou descendência entre as TUs (Polanski e Kimmel, 2007; Mount, 2004). As folhas representam as unidades taxonômicas operacionais (OTU; do inglês, *operational taxonomic unit*) e os nós internos são denominados TUs ancestrais. A raiz de uma árvore é o nó que representa o ancestral comum a todas as TUs em estudo. A topologia é o padrão de ramificação de uma árvore.

A maioria dos métodos de construção produz árvores filogenéticas não enraizadas (Buso, 2005). A raiz de uma árvore filogenética pode ser obtida pela adição de dados de um grupo externo — *outgroup* — ao conjunto, isto é, um *taxon* que está ramificado fora do grupo a ser analisado, mas que seja relacionado molecularmente.

O objeto da análise filogenética é identificar as relações entre os galhos de uma árvore e o comprimento desses galhos (Mount, 2004). Para estabelecer estas relações podem ser utilizadas diferentes abordagens na construção de uma árvore filogenética (Polanski e Kimmel, 2007).

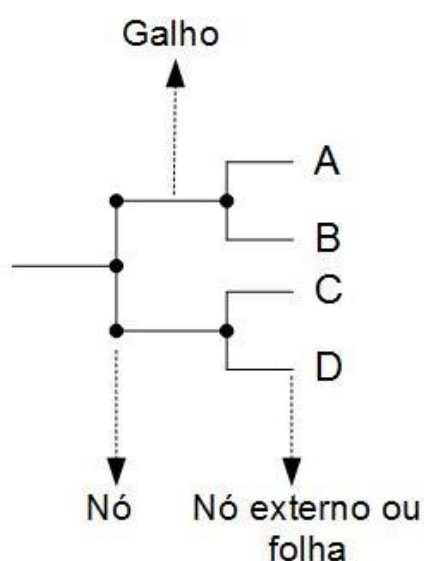


Figura 5. Representação de uma árvore filogenética.

Cada nó representa uma divisão no caminho evolutivo. O comprimento dos galhos até o nó seguinte representa o número de variações que ocorreu antes do próximo nível de bifurcação. A, B, C e D representam as OTUs. Adaptado de Mount, 2004.

1.6.2. Métodos de construção de árvores filogenéticas

De maneira geral, três métodos — máxima parcimônia, distância entre vizinhos e máxima verossimilhança — são utilizados para encontrar a árvore evolutiva que melhor se adequa às variações observadas em um determinado grupo de sequências (Mount, 2008). Em virtude do número de topologias possíveis ser muito grande, esses métodos podem produzir mais de uma árvore que se encaixe em um critério escolhido (Polanski e Kimmel, 2007; Mount, 2008). Os padrões de ramificação das árvores podem ser comparados para encontrar os galhos compartilhados e, assim, melhor suportados pelos dados.

O método da máxima parcimônia prediz a árvore evolutiva que minimiza o número de passos requeridos para gerar a variação observada nas sequências (Mount, 2008). Este método considera todas as topologias possíveis para definir a árvore adequada. Portanto, o número de árvores não enraizadas aumenta rapidamente com o aumento do número de *taxa* presentes nas amostras analisadas (Buso, 2005). Sendo assim, o número de topologias possíveis é arbitrariamente grande, o que torna a aplicação desse método limitada para um conjunto grande de dados (Polanski e Kimmel, 2007; Mount, 2004). As funções (a e b), descritas abaixo, ilustram o número de possibilidades de topologias — de árvores com e sem raízes — para um número n de OTUs:

$$\text{a) } N^{\text{não enraizadas}}(n) = \frac{(2n-5)!}{2^{n-3}(n-3)!}$$

$$\text{b) } N^{\text{enraizadas}}(n) = \frac{(2n-3)!}{2^{n-2}(n-2)!}$$

Nos métodos de distância entre vizinhos — do inglês *neighbor joining* — a árvore é construída pela aproximação de sequências, com a menor distância entre essas (Polanski e Kimmel, 2007).

Para encontrar uma árvore que melhor suporte e represente os dados genômicos, no método da máxima verossimilhança é assumido um modelo evolutivo probabilístico (Polanski e Kimmel, 2007; Buso, 2005). A abordagem utilizada por este método é especialmente acurada e alguns estudos apontam que esse método pode recuperar a árvore correta com maior frequência que outros métodos de construção de árvores filogenéticas (Guindon e Gascuel, 2003).

Um dos aspectos mais significativos resultantes de análise filogenética é a possibilidade de realizar predições relativas à árvore da vida (Mount, 2004; Woese, 2000). Para esse propósito, o gene selecionado para a análise deve estar universalmente presente e ser

facilmente reconhecível pela conservação de sequência entre as espécies. Ao mesmo tempo, deve haver variabilidade suficiente na sequência, que permita determinar quais grupos de organismos dividem a mesma origem filogenética (Fritze, 2004; Mount, 2004; Xu e Côté, 2003). Dentre as sequências que atendem esses pré-requisitos, os genes que codificam rRNA 16S, aqui também referidos como rDNA 16S, ou os respectivos produtos, são o mais amplamente utilizados.

1.7. Genes de rRNA 16S

Em 1965, Dubnau e cols. observaram uma conservação entre sequências de rDNA 16S de espécies de *Bacillus* e que era possível estabelecer uma relação entre esses organismos baseando-se nessas sequências. Baseado nesse conhecimento, nos anos 1970, Carl Woese iniciou um trabalho pioneiro de classificação de seres vivos (Clarridge, 2004; Woese, 1987). O grupo de pesquisadores liderado por Woese mostrou que as relações filogenéticas entre todos os organismos poderiam ser determinadas a partir da comparação de porções estáveis do código genético (Vinje *et al.*, 2014; Clarridge, 2004; Woese, 1987). Desde as primeiras observações realizadas por Dubnau e cols. ocorreu uma evolução nos estudos de genes que poderiam ser utilizados para estabelecer relações entre os organismos. Hoje os principais candidatos para estabelecer essas relações são os genes que codificam os RNA ribossomais 5S, 16S e 23S em procariotos, 18S e 28S em eucariotos, além das sequências situadas entre esses genes. A figura 6 mostra a árvore universal da vida baseada na relação de sequências de rDNA 16S.

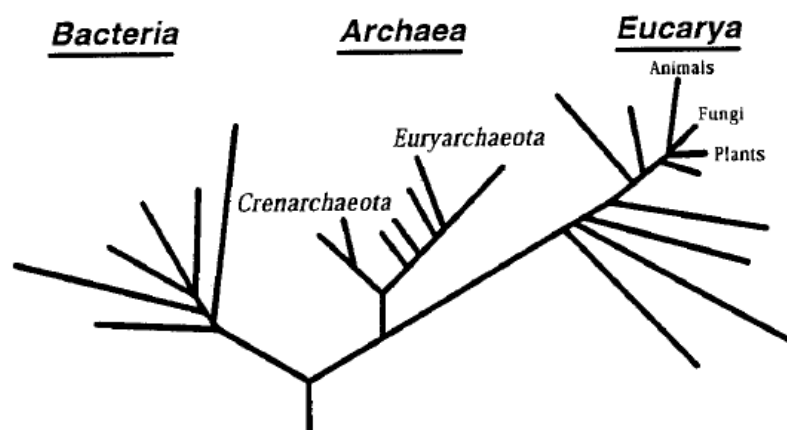


Figura 6. Árvore filogenética universal. As relações entre os três domínios da vida foram baseadas em comparações de sequências de genes de rRNA 16S e 18S, de organismos procariotos e eucariotos, respectivamente. Adaptado de Woese, 2000.

As sequências de rDNA/rRNA 16S possuem cerca de 1.600 pares de base (pb) ou nucleotídeos (nt), respectivamente, e são compostas por regiões conservadas e variáveis (Clarridge, 2004). Essas são consideradas cronômetros moleculares apropriados porque estão distribuídas universalmente; têm função essencial; são suficientemente conservadas, mas apresentam regiões de variabilidade interespecies e o tamanho das sequências é adequado para permitir uma visão estatisticamente consistente da evolução englobando todos os seres vivos, considerando o homólogo funcional rDNA 18S em eucariotos (Maughan e Van der Auwera, 2011; Clarridge, 2004; Woese, 1987). A informação que identifica os diferentes *taxa* é encontrada nas regiões variáveis do rDNA 16S (Vinje *et al.*, 2014).

Uma das características que torna o rDNA imprescindível para a viabilidade celular em bactérias é a complementariedade da região 3' do rRNA 16S à extremidade 5', não traduzível, do mRNA, denominada sequência de Shine-Dalgarno, ou sítio de ligação ao ribossomo (SLR). Tal complementariedade permite que o ribossomo permaneça unido à fase de leitura do mRNA. Sendo assim, a sequência complementar ao SLR é uma das características mais significativas e mais conservadas nos genes de rRNA 16S (Rajendhran e Gunasekaran, 2011).

A análise das sequências de genes de rRNA 16S é usada em duas aplicações principais: (i) identificação e classificação de espécies procarióticas em culturas puras e (ii) estimativa da diversidade bacteriana total em amostras ambientais por metagenômica (Rajendhran e Gunasekaran, 2011).

À medida que os bancos de rDNA 16S aumentaram, novos grupos taxonômicos foram descobertos (Baker *et al.*, 2003) e esse fato representa uma grande importância no avanço nos estudos de Ecologia Microbiana. Os principais bancos de sequências de rDNA 16S — GenBank, Greengenes, *Ribosomal Database Project* (RDP) e SILVA — oferecem ferramentas de alinhamento e análise de sequências de subunidades rRNA de linhagens de *Bacteria* e *Archaea* (Vinje *et al.*, 2014; Maughan e Van der Auwera, 2011; Cole *et al.*, 2009). Uma das ferramentas de análise disponíveis pelo RDP, o *Classifier*, é utilizada para garantir o posicionamento de cada organismo em *taxa* apropriados e tem sensibilidade em nível de gênero (Wang *et al.*, 2007).

Embora amplamente empregada, a metodologia que utiliza genes de rRNA 16S como marcador filogenético tem recebido diversas críticas, que apontam para a superestimação da relevância em utilizar uma única molécula como marcador genômico para estabelecer a história evolutiva de uma espécie (Ludwig, 2007). A presença de múltiplas cópias dos operons rDNA e a heterogeneidade de sequências rDNA 16S intra espécie, em muitos casos, são fatores limitantes para o uso desses genes na identificação de espécies (Rajendhran e

Gunasekaran, 2011; Dahllöf *et al.*, 2000). Também há críticas em relação aos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação dos genes de rDNA 16S. Alega-se que os *primers* complementares às regiões conservadas dos grupos presentes na árvore filogenética universal não são, necessariamente, complementares a todos os grupos existentes (Baker *et al.*, 2003).

Em adição, para espécies estreitamente relacionadas, o uso do rRNA 16S se mostra limitado. Por exemplo, dentro dos grupos do *B. cereus* e do *B. subtilis* o baixo nível de divergência entre essas moléculas limita a resolução das relações entre as espécies (Maughan e Van der Auwera, 2011).

Apesar das críticas mencionadas, a análise das sequências de rDNA 16S é muito útil para posicionar um organismo em um gênero ou família (Rajendhran e Gunasekaran, 2011). Esse tipo de análise pode ser complementado pela adição de genes de expressão constitutiva, que evoluem mais rapidamente que o rDNA 16S, e por uma caracterização genômica mais aprofundada para investigar as diferentes linhagens, levando também em consideração dados ecológicos e fenotípicos para corroborar os dados obtidos por taxonomia molecular (Maughan e Van der Auwera, 2011).

2. Justificativa

O desenvolvimento de novas técnicas para detecção, isolamento e caracterização de microrganismos proporcionou um conhecimento mais real da diversidade do mundo microbiano. Ainda assim, muitas vezes os novos *taxa* propostos não refletem a diversidade de uma espécie, pois a caracterização é baseada em apenas uma única linhagem, o que não reflete, necessariamente, a diversidade intra espécie (Fritze, 2004). Tal fato pode provocar emendas taxonômicas após novos isolamentos.

De fato, por muitas décadas a taxonomia do gênero *Bacillus* mostrava-se bem estabelecida, considerando as características fenotípicas como chave para caracterização (Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Entretanto, desde os anos 1990, espécies do gênero têm sido frequentemente realocadas em outros gêneros, assim como novos gêneros têm sido propostos para alocar as novas espécies descritas. Conseqüentemente, na literatura especializada, o nome do gênero está sempre associado ao termo “e outras espécies relacionadas”. A compreensão sobre a diversidade do grupo resultou na ampliação do termo para bactérias aeróbias formadoras de endósporos ou Bafes.

A necessidade de reclassificar as linhagens de *Bacillus spp.* e criar novos gêneros que possam comportar linhagens reconhecidamente pertencentes a outros foi reconhecida imediatamente a partir do teor de G+C, que varia entre 32-50% e da taxonomia baseada em dados fenotípicos (Galperin, 2013; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Essa adequação da taxonomia está ocorrendo, de maneira mais significativa, graças às análises de sequências de genes de rRNA 16S, que permite reconhecer uma maior diversidade entre gêneros. Por esta razão, o ritmo de mudança na taxonomia tem sido intenso. Conseqüentemente, existe uma demanda crescente para identificação e classificação efetiva de Bafes, por razões que incluem conhecimento básico sobre a diversidade, taxonomia apropriada, saúde pública, biodefesa, exploração do potencial biotecnológico, dentre outros.

Grandes plasmídeos de Bafes portam informações de virulência e o conhecimento do perfil plasmidial das linhagens de Bafes é importante para iniciar a investigação sobre esses elementos genéticos e correlacionar com fenótipos observados (Andrup *et al.*, 2008). Existem poucos estudos que caracterizam o perfil plasmidial de Bafes, sendo que as linhagens do grupo do *B. cereus* são as mais caracterizadas. Portanto, a investigação do perfil plasmidial das linhagens que compõem a Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporo (Cbafes), do Laboratório de Bafes (LaBafes), é essencial para avaliar e nortear futuros trabalhos com essas linhagens e a exploração do potencial tecnológico do acervo.

Atualmente a CBafes conta com 154 linhagens ambientais, isoladas pelo grupo de pesquisa do LaBafes, a partir de amostras de solo do Distrito Federal (DF), designadas

SDF0001-SDF0154. Recombinantes de *B. thuringiensis* e *B. circulans* que expressam uma proteína de fluorescência verde (GFP), construídos no LaBafes, a linhagem de *Bacillus cereus* FT9, isolada de uma fonte termal e com genoma completamente sequenciado, além de diversas linhagens tipos e hospedeiras para expressão heteróloga oriundas de grandes coleções nacionais e internacionais completam o acervo atual. As linhagens SDFs são caracterizadas continuamente por uma abordagem polifásica e, presentemente, a CBafes está sendo ampliada e estruturada.

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Caracterização molecular de linhagens selecionadas de Bafes isoladas do solo do DF, depositadas na CBafes, por sequências amplificadas utilizando genes de rDNA 16S como molde. As sequências desses genes foram utilizadas na análise das relações filogenéticas das Bafes de interesse. Essa análise foi complementada pela avaliação do perfil plasmidial destas linhagens.

3.2. Objetivos específicos

- **Construção de árvore filogenética**

- Isolamento de DNA total das linhagens de interesse;
- Amplificação do gene rDNA 16S por PCR;
- Sequenciamento dos produtos de PCR pelo método de Sanger.

- **Perfil plasmidial**

- Extração de DNA plasmidial;
- Análise de perfil plasmidial em gel de agarose.

4. Material e métodos

4.1. Linhagens

As amostras utilizadas nesse trabalho foram isoladas previamente pela equipe do laboratório coordenado pela Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza (UnB, IB, Cel, LBafes). Amostras de solo de duas áreas diferentes do DF, georreferenciadas por GPS, foram coletadas e submetidas a um choque térmico a 80 °C. As amostras foram inoculadas em meio sólido e seguiu-se uma seleção por morfologia de colônias. A presença de esporos foi confirmada posteriormente por microscopia de contraste de fase (MCF). As linhagens selecionadas foram induzidas à esporulação em caldo nutriente ou HCT. As culturas com maior parte da população esporulada foram submetidas a choque térmico, para eliminar as células vegetativas remanescentes. Uma alíquota da cultura contendo a suspensão de esporos foi aplicada em tiras de papel de filtro estéreis e armazenada em tubos de criopreservação, a temperatura ambiente. As linhagens foram caracterizadas quanto a morfologia de célula vegetativa, morfologia do esporângio, morfologia e posição do esporo, coloração de Gram e teste de hemólise e designadas SDF (Solo do Distrito Federal) seguido de numeral (SDF0001-SDF0154). Dentre as 154 amostras 45 foram selecionadas, aleatoriamente, para as análises aqui propostas. Algumas características fenotípicas das amostras selecionadas estão apresentadas na tabela I.

4.2. DNA total

Uma colônia de cada estirpe de interesse foi crescida em meio BHI (*Brain Heart Infusion*, Acumedia) a 28 °C com agitação (200 rpm) até a A_{600} 1,5-2,0. O tempo de crescimento dos isolados foi bastante variável, entre 12 h e 60 h. Quatro mL da suspensão de células foram centrifugadas a 8.000 x g, a 4 °C. As células foram ressuspensas em 150 µL de TES (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 20% sacarose) contendo 4 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 h e recuperadas por centrifugação nas mesmas condições descritas acima. O DNA total foi obtido utilizando-se o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O resultado da extração foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para documentação.

Tabela I. Características fenotípicas de linhagens da CBafes

Linhagem SDF	Esporo		Gram	Hemólise		Motilidade
	Morfologia	Posição no esporângio		(28 °C)	(37 °C)	
0001	oval	ND	positivo	+	+	+
0002	oval	subterminal	variável	+	+	+
0003	oval	central	variável	+	+	NO
0004	circular	subterminal	variável	+	+	NO
0005	circular	terminal, deformante	variável	+	+	+
0006	oval	subterminal	positivo	+	+	NO
0008	oval	central, deformante	positivo	-	-	+
0009	oval	ND	positivo	+	+	NO
0010	oval	subterminal	variável	+	+	+
0011	circular	terminal	variável	+	+	NO
0012	circular	terminal	variável	+	+	+
0013	oval	subterminal	variável	+	+	+
0014	oval	subterminal, deformante	variável	-	-	+
0015	oval	deformante	variável	+	+	NO
0016	oval	terminal	variável	-	-	+
0017	oval	terminal, deformante	variável	+	+	+
0018	oval	terminal, deformante	variável	+	+	+
0019	circular	ND	variável	+	+	+
0020	oval	ND	positivo	-	-	+
0021	oval	subterminal	positivo	-	-	NO
0022	oval	subterminal	variável	+	+	NO
0023	circular	subterminal	variável	-	-	NO
0025	oval	subterminal	variável	+	+	NO
0026	oval	ND	variável	+	+	NO
0027	circular	ND	variável	+	+	+
0028	oval	central, deformante	variável	-	-	+
0029	circular	terminal	variável	-	-	+
0030	oval	terminal	positivo	-	-	NO
0032	oval	terminal, deformante	variável	+	-	NO
0037	circular	terminal, deformante	variável	+	+	+
0043	circular	terminal a central	variável	-	-	+
0047	oval	subterminal a central	variável	-	-	+
0049	oval	terminal a subterminal	variável	-	-	NO
0050	circular	subterminal	variável	-	-	+
0051	circular	terminal a subterminal	variável	-	-	NO
0054	oval	subterminal	variável	-	-	NO
0057	circular	terminal	variável	-	-	NO
0062	circular	terminal	variável	+	+	+
0063	oval	terminal a central	positivo	+	+	NO
0064	oval	terminal a subterminal	variável	-	-	NO
0065	oval	terminal	variável	-	-	NO
0066	oval	terminal a subterminal	variável	-	-	+
0068	oval	terminal a central	variável	-	-	+
0100	oval	terminal	positivo	+	+	+
0101	oval	ND	positivo	+	+	+

ND: Não determinado. Algumas linhagens apresentam células muito pequenas, assim a posição do esporo não pode ser determinada por MCF.

NO: Não observado. Não foram realizados testes específicos de motilidade e a, eventual, presença de motilidade foi observada apenas pelo movimento celular sob MCF.

4.3. Amplificação de rDNA 16S

Um microlitro de DNA total diluído em 1:100 foi adicionado à mistura de reação de PCR contendo 0,4 μmol de cada *primer* (27F: 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'; 1492R: 5' GGY TAC CTT GTT AGG ACT T 3'; Frank *et al.*, 2008); 1,5 U de Taq polimerase (Sigma); 0,15 mM de dNTP; 3 mM de MgCl_2 ; tampão 1x em um volume total de 25 μL . O DNA alvo foi amplificado em termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando as seguintes condições: 94 °C por 30 s; 52 °C por 30 s, 72 °C por 1,5 min, num total de 25 ciclos seguidos de um período adicional de extensão a 72 °C de 10 min. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1% em TAE, corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV e fotografado para documentação.

4.4. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados das bandas excisadas do gel de agarose utilizando-se o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1% em TAE, corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV e fotografado para documentação. As amostras foram quantificadas com o programa *ImageJ* (*National Institute of Health*) e 100 ng de DNA foram enviados para sequenciamento.

4.5 Sequenciamento

As sequências de rDNA 16S foram obtidas pelo método de Sanger utilizando os serviços da empresa MacroGen (www.macrogen.com) e do Laboratório de Biologia Molecular da UnB. As sequências foram confrontadas contra dois bancos de dados — Genbank e *Ribosomal Database Project* (RDP) — para identificação dos organismos. Após a identificação foi utilizada a ferramenta *Classifier*, disponível no sítio do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>), para confirmar o posicionamento dos organismos nos *taxa* apropriados.

4.6. Construção das árvores filogenéticas

A construção das árvores foi feita *online* no sítio www.phylogeny.fr. Para o alinhamento das sequências foi utilizada a ferramenta ClustalW. Após o alinhamento as sequências foram depuradas com o aplicativo GBlocks. A árvore foi construída utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o algoritmo PhyML, aplicando-se análise

bootstrap com 100 réplicas. A representação gráfica das árvores foi feita pelo aplicativo TreeDyn.

4.7. Extração de DNA plasmidial

As células foram crescidas em meio LB suplementado com 20 mM de L-treonina (Vetec), a 28 °C e com agitação de 200 rpm. Dez mL da cultura foram centrifugados a 13.000 x g por 10 min a 4 °C. As células foram lavadas com 2 mL de STE gelado (30 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 50 mM de NaCl; pH 8,0) e centrifugadas nas mesmas condições. As células foram ressuspendidas em 2 mL de tampão de lise (STE adicionado de 20% de sacarose, 4mg/mL de lisozima), incubadas a 37 °C até a formação de protoplastos, monitorada por MCF. O DNA plasmidial dos protoplastos, coletados por centrifugação nas mesmas condições acima, foi extraído, por lise alcalina e purificado, em coluna de afinidade, utilizando o kit QIAprep Miniprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial foi analisado em gel de agarose 0,5%, em tampão TAE 1X, a 4 °C, em paralelo com o DNA plasmidial de *Escherichia coli* ETEC H10407, gentilmente cedida pelo prof. dr. Alex Leite Pereira. O padrão de migração das moléculas de DNA foi visualizado em luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 12 h, posterior descoloração em H₂O destilada, por 24 h, sob agitação e documentado com auxílio de câmera fotográfica digital.

5. Resultados e Discussão

A Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes), da UnB/IB/Departamento de Biologia Celular, está localizada no Laboratório de Microbiologia/LaBafes que é especializado em estudos da Biologia de linhagens de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) de interesse científico e com potencial tecnológico para os setores médicos, humano e animal, agropecuário, ambiental e industrial. A importância de estudos básicos da diversidade e potencialidades biotecnológicas de Bafes levou ao isolamento, identificação e preservação de linhagens de solo do DF com diferentes características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. Após a seleção de Bafes, por choque térmico, este acervo biológico foi avaliado por métodos microbiológicos clássicos que incluem caracterização fenotípica por microscopia de contraste de fase quanto à morfologia de células vegetativas, esporângio e esporos; localização do pré-esporo e deformação ou não da célula mãe; bem como resposta à coloração de Gram e atividade hemolítica. Atualmente, a coleção dispõe de um acervo catalogado com 190 amostras, sendo 154 linhagens selvagens, compreendendo duas subcoleções: a primeira, composta de linhagens produtoras de cristais parasporais e, a segunda, de linhagens não produtoras. Estas linhagens, isoladas de Solo do Distrito Federal, foram designadas SDF0001-SDF0154 e estão estocadas à temperatura ambiente, em forma de esporos.

Este trabalho teve como objetivo geral a caracterização molecular, por sequências de genes de rRNA 16S, de 45 linhagens SDF selecionadas aleatoriamente (Tabela I) do acervo da CBafes. Os dados obtidos pelo sequenciamento destes genes foram utilizados na análise da diversidade dos microrganismos de interesse. Esta análise foi complementada com a avaliação do perfil plasmidial destas linhagens.

Em razão do alto número de amostras estudadas nesse trabalho e visando, num futuro próximo, estender essas análises para todo o acervo da CBafes foi realizada uma busca por métodos rápidos, de baixo custo e eficientes para extração de DNAs total e plasmidial. É sabido que as espécies do filo *Firmicutes* possuem PC bastante rígida com diversas camadas de peptideoglicano (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009). A extração de DNA da maioria das linhagens requer a remoção previa das camadas de PG.

Desta forma foi realizado um pré-tratamento das células de interesse com lisozima em diferentes concentrações (4, 10 e 50 mg/mL) em tampão com proteção osmótica, visando a obtenção de protoplastos. As concentrações de lisozima utilizadas foram baseadas em estudos que empregam diferentes faixas de concentrações da enzima (Xu e Côtè, 2003; Joung e Côtè,

2001). Entretanto a digestão não foi bem sucedida para algumas linhagens (Tabela IV), conforme avaliado por microscopia ótica. Assim como para outras bactérias Gram positivas, a resistência à lisozima pode ser explicada, pelos menos em parte, por diferenças estruturais da PCs resultando na variabilidade de eficiência na obtenção de protoplastos.

Segundo Westmacott e Perkins (1979) e Chassy (1976), em razão da desacetilação dos resíduos de N-acetilglicosamina de peptidoglicano da PC, algumas espécies de *Bacillus* e de outras Gram positivas, são resistentes à ação da lisozima. Tal resistência pode configurar uma estratégia de defesa desses microrganismos.

Tal resistência foi parcialmente contornada pela adição de 20 mM de L-treonina ao meio BHI (Chassy, 1976). Em *Staphylococcus aureus* a L-treonina, por competição, inibe a incorporação da L-lisina, no aminoácido da terceira posição — que compõe a estrutura da PG — durante a síntese da PC, modificando a estrutura e facilitando o acesso da enzima ao substrato.

Possivelmente, em *Bacillus* e gêneros relacionados, a mudança estrutural provocada pela incorporação de L-treonina possa acontecer de forma semelhante, substituindo o resíduo de aminoácido de terceira posição da unidade de peptidoglicano.

Adicionalmente, o meio utilizado influencia na suscetibilidade à lisozima, sendo que Chassy (1976) observou que o BHI oferece um maior rendimento na produção de protoplastos. Apesar de a maioria das amostras crescidas em meio BHI suplementado com L-treonina apresentar lise da PC, algumas amostras continuaram resistentes à lisozima (Tabela II).

Apesar da dificuldade em obter protoplastos para 17/45 (37,77%) linhagens (Tabela II), sob MCF foi observado que algumas dessas células apresentaram um aspecto rugoso e sem morfologia definida, bem diferente da aparência externa das células intactas, em forma de bastão bem definido. Quando esse estado foi observado, as células de linhagens SDF foram submetidas a extração de DNA total ou plasmidial. Portanto, a adição de L-treonina solucionou em parte o problema da resistência à lisozima.

Em análises futuras será necessário buscar enzimas alternativas à lisozima, para obter a remoção de PCs dessas linhagens de forma controlada para a obtenção de DNA em quantidade e qualidade apropriadas para as análises de interesse. Outra alternativa seria buscar novas metodologias, como aquela proposta por Bera e cols. (2007) que propuseram acrescentar uma concentração sub-letal de penicilina para diminuir as ligações cruzadas pela inibição da transpeptidase, enzima que catalisa o passo final da biossíntese de PC.

5.1. Análise de perfil plasmidial

O perfil plasmidial é uma ferramenta importante para caracterização e para investigar a ecologia de linhagens bacterianas (Moura, *et al.*, 2012; Reyes-Ramírez e Ibarra, 2007). Apesar disto o perfil plasmidial é geralmente negligenciado, principalmente, pela possibilidade de as linhagens perderem espontaneamente os plasmídeos e pela dificuldade em empregar as técnicas de extração de plasmídeos. Tais dificuldades refletem na pouca disponibilidade de informações sobre perfil plasmidial de linhagens ambientais na literatura, isso motiva a inclusão dessa análise neste trabalho. Outro problema para a análise do perfil plasmidial é o fato de que os megaplasmídeos são facilmente degradados durante a extração/purificação e também durante o armazenamento, impossibilitando a visualização desses elementos em géis de agarose.

Como foi discutido anteriormente, a extração de DNA plasmidial foi dificultada pela resistência de parte das linhagens de interesse a ação da lisozima. Para contornar a limitação na obtenção de DNA plasmidial de linhagens resistentes foi realizado um teste, adicionalmente ao tratamento com lisozima, com proteinase K com o objetivo de clivar as ligações cruzadas da PC (peptídicas) nessas linhagens. Entretanto, este tratamento não resultou em formação de protoplastos.

Mesmo sem sucesso na obtenção de protoplastos para todas as linhagens foram testados diversos métodos para extração. O que melhor se adequou às propostas deste trabalho foi aquele proposto por Reyes-Ramírez e Ibarra em 2007. Este é um método simples, de baixo custo e não utiliza lise alcalina. A vantagem de um método que não utiliza lise alcalina é que é possível obter elementos extra-cromossomais lineares.

Antes de aplicar o método às amostras da CBafes foi realizada uma avaliação do método com linhagens tipo de *B. thuringiensis* utilizando o método proposto por Reyes-Ramírez e Ibarra (2007) e comparado com um segundo utilizando o *kit* para a obtenção de DNA plasmidial (Qiagen), que emprega a lise alcalina para extração de DNA plasmidial superenovelado e purificação por coluna de afinidade. Para as linhagens tipo testadas, o primeiro método se mostrou eficiente resultando em um padrão de bandas semelhante ao obtido com o *kit*. A diferença entre as duas preparações foi a presença da banda referente ao DNA cromossomal, que não é eliminada pelo método que não utiliza lise alcalina (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2007).

Com o sucesso nesta avaliação foi iniciado o teste com amostras da CBafes. Inicialmente foram utilizadas as linhagens SDF0001, SDF0002, SDF0003, SDF0004, SDF0005 e SDF0006. Como não foi obtida a formação de protoplastos, estas amostras não foram úteis para avaliar o método.

O método proposto por Reyes-Ramírez e Ibarra (2007) tem a grande desvantagem de demandar um longo tempo de manipulação. A ausência de um passo de purificação de DNA,

resulta em material altamente perecível, necessitando de ser analisadas imediatamente após a extração. Por esse motivo um *kit* disponível comercialmente foi utilizado para a obtenção do DNA plasmidial para as análises.

Para a utilização do *kit* (Qiagen) foram necessárias mudanças nas condições de crescimento. As células foram crescidas em meio LB suplementado com 20 mM de L-treonina. O rendimento de formação de protoplastos foi menor, mas o crescimento em BHI (meio mais rico que o LB) poderia ocasionar um aumento na produção de carboidratos associados a PC das células, o que além de dificultar a manipulação das mesmas por causa da viscosidade, poderia contribuir para a ineficiência da lisozima e bloquear a coluna de cromatografia de afinidade empregada para a purificação do DNA extraído.

Para 28/45 (62,2%) das linhagens SDF foi observada a produção de protoplastos utilizadas na extração de plasmídeos (Tabela II). Apesar da obtenção de protoplastos, para algumas linhagens não foi observada a presença de plasmídeos. Por outro lado, algumas linhagens cuja PC não foi completamente removida foi possível observar plasmídeos (Tabela II). Tais resultados foram reprodutivos em experimentos independentes.

Tabela II. Obtenção de protoplastos e plasmídeos (por lise alcalina) das linhagens selecionadas

Linhagem SDF	0001	0002	0003	0004	0005	0006	0008	0009
Protoplasto	+	+	-	-	-	-	-	+
Plasmídeo	-	-	-	-	-	+	-	-
Linhagem SDF	0010	0011	0012	0013	0014	0015	0016	0017
Protoplasto	+	-	+	-	+	+	+	-
Plasmídeo	-	+	-	+	-	+	-	+
Linhagem SDF	0018	0019	0020	0021	0022	0023	0025	0026
Protoplasto	+	+	+	+	+	+	+	-
Plasmídeo	-	-	+	+	-	-	-	-
Linhagem SDF	0027	0028	0029	0030	0032	0037	0043	0047
Protoplasto	-	-	+	+	-	-	-	+
Plasmídeo	-	-	+	+	-	-	-	+
Linhagem SDF	0049	0050	0051	0054	0057	0062	0063	0064
Protoplasto	-	+	+	-	+	-	+	+
Plasmídeo	-	-	+	-	+	+	-	+
Linhagem SDF	0065	0066	0068	0100	0101			
Protoplasto	+	+	+	+	+			
Plasmídeo	+	+	+	+	+			

A não observação de plasmídeos pode ser resultado da quebra dos mesmos durante a manipulação, muitas vezes constatada pelo rastro de DNA sem banda definida observada para algumas amostras (Figura 9). Alternativamente, o baixo número de cópias associado ao baixo rendimento da extração/purificação poderia estar aquém do limite de detecção do método, que é de 10 ng/banda, mesmo tendo aplicado grandes quantidades do DNA no gel de agarose. Outro fato que também pode ser especulado é a perda, ou cura, espontânea de plasmídeos durante a cultura em laboratório, que não considerou, para esta análise, as condições físico-químicas ótimas de crescimento das linhagens. A cura plasmidial ainda pode ser explicada pela decorrência da forte pressão seletiva que existe sobre esses elementos.

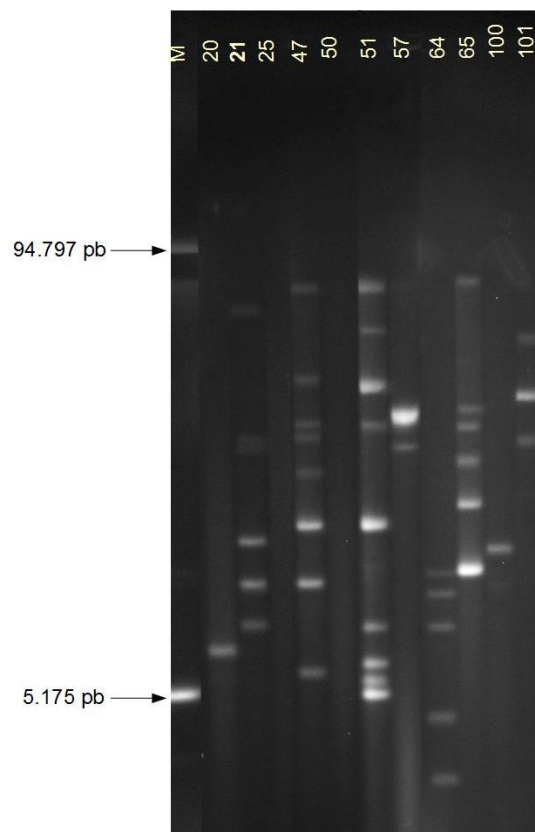


Figura 7. Perfil plasmidial de linhagens SDF de Bafes isoladas de solo do DF. O DNA plasmidial foi obtido por lise alcalina precedida de tratamento com lisozima. O DNA plasmidial superenovelado de *E. coli* ETEC H10407 foi obtido nas mesmas condições, exceto pela ausência de tratamento com lisozima, foi utilizado como marcador de massa molecular (M). Os números acima das colunas correspondem às linhagens SDF.

Após a extração do DNA, o perfil plasmidial das linhagens foi avaliado em gel de agarose 0,5%, em paralelo com o DNA plasmidial da *E. coli* ETEC H10407 (Crossman *et al.*, 2010). Os plasmídeos dessa linhagem foram utilizados como marcador de DNA plasmidial superenovelado.

Apesar das dificuldades na obtenção de DNA plasmidial, os resultados obtidos corroboram aqueles obtidos por análise filogenética. Existe uma grande diversidade de linhagens em uma pequena amostra da CBafes. O perfil plasmidial apresentado pelas linhagens (nas quais foi possível a observação de plasmídeos), mostra complexidade e diversidade, indicando o potencial dessa investigação nas amostras da coleção.

Algumas amostras apresentaram similaridade de sequência de rDNA 16S com *B. megaterium* (tabela III) e foram agrupadas com essa espécie na árvore filogenética apresentada na figura 12. Alguns estudos que analisaram o perfil plasmidial de diversas linhagens de *B. megaterium* mostram uma grande variabilidade no conteúdo plasmidial, mas todas as linhagens analisadas apresentam pelo menos 4 plasmídeos com tamanhos variáveis de 2 a 165 kb (Rosso e Vary, 2005; Von Tersch e Carlton, 1983; Stahl e Esser, 1983). As linhagens SDF0021 e SDF0051 têm seus perfis plasmidiais apresentados na figura 9 onde observa-se a presença de pelo menos 5 plasmídeos com tamanhos variáveis, compatíveis com o padrão geral observado em outros estudos que investigam o perfil plasmidial de diferentes linhagens de *B. megaterium* (Rosso e Vary, 2005; Von Tersch e Carlton, 1983; Stahl e Esser, 1983).

As linhagens do grupo do *B. cereus* apresentam perfil plasmidial complexo e as informações contidas nesses elementos extra-cromossomais são imprescindíveis para a diferenciação entre as espécies (Van der Auwera e Mahillon, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003; Schnepf *et al.*, 1998). Os plasmídeos responsáveis pela virulência das espécies de *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* estão localizados em grandes plasmídeos (Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013; Van der Auwera e Mahillon, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2003; Wilcks *et al.*, 1998). Pode-se citar o exemplo do plasmídeo encontrado em linhagens de *B. cereus* pCERE01 que codifica a toxina cereulídeo e tem 200 kb (Ehling-Schulz e Messelhäuser, 2013, Hoton *et al.*, 2005). Dentre as linhagens SDF que apresentaram similaridade com linhagens do grupo do *B. cereus* (tabela III) a obtenção de protoplastos foi possível apenas para a SDF0030 e a SDF0100. Como observado na Figura 9, existe a presença de rastro onde o DNA plasmidial da linhagem SDF0030 foi aplicado no gel, o que indica a possibilidade de quebra de grandes plasmídeos durante a extração de DNA. É sabido que grandes plasmídeos têm tendência à

quebra durante a extração, o que dificulta a visualização dos mesmos em gel de agarose (Moura, *et al.*, 2012; Reyes-Ramírez e Ibarra, 2007).

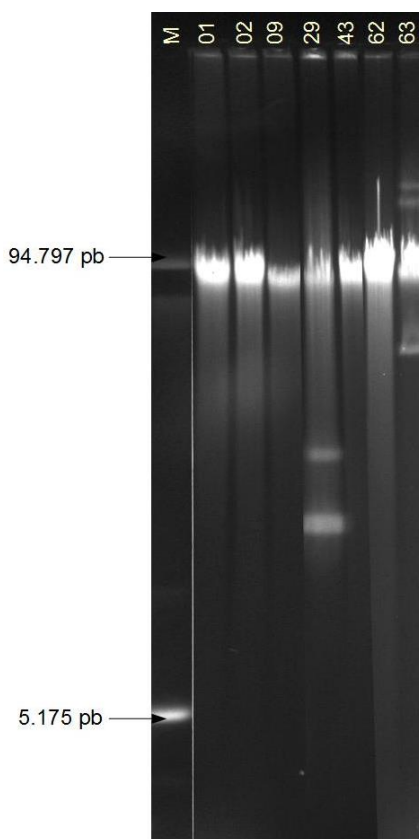


Figura 8. Perfil plasmidial de linhagens SDF de Bafes isoladas de solo do DF. O DNA plasmidial foi obtido com o método proposto por Reyes-Ramírez e Ibarra (2007). O DNA plasmidial superenovelado de *E. coli* ETEC H10407 foi obtido por lise alcalina e utilizado como marcador massa molecular (M). Os números acima das colunas correspondem às linhagens SDFs.

Para fazer comparações mais significativas a respeito dos perfis plasmidiais obtidos nesse trabalho é preciso que a lise de PC e o protocolo para isolamento e purificação do DNA plasmidial sejam otimizados para o grupo de microrganismos selecionado para este trabalho. Como já foi dito anteriormente, as Bafes têm parede celular muito rígida e isso dificulta bastante a execução do isolamento apropriado de DNA plasmidial.

A identificação e a classificação de plasmídeos têm sido aspectos importantes nas décadas recentes para traçar a origem evolutiva dos plasmídeos e elucidar seu papel nos processos ambientais e na adaptação microbiana (Moura *et al.*, 2013; Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008). O perfil plasmidial é uma ferramenta comumente utilizada para caracterizar e identificar as linhagens responsáveis por diversas infecções em humanos como, por exemplo, aquelas causadas por *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp. (Bosco *et al.*, 2012; Abriouel *et al.*, 2006; Grattard, *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1991; Zuccarelli *et al.*, 1990). Quando se trata do perfil plasmidial de bactérias ambientais existem poucos registros que estão associados a espécies potencialmente patogênicas como o *B. cereus* e espécies relacionadas.

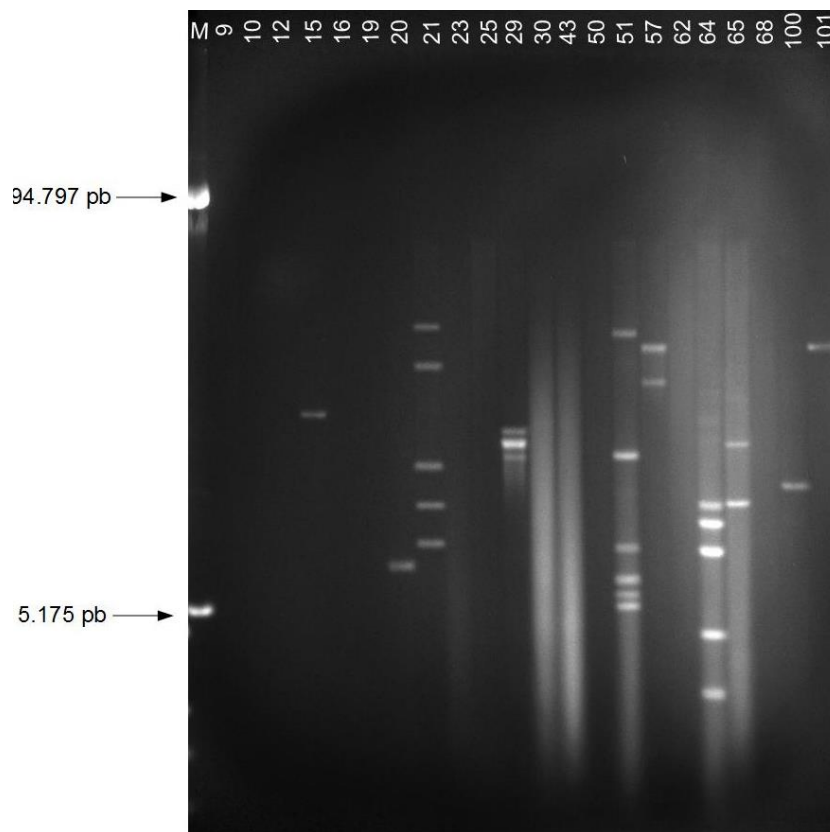


Figura 9. Perfil plasmidial de linhagens SDF de Bafes isoladas de solo do DF. O DNA plasmidial foi obtido por lise alcalina precedida de tratamento com lisozima. O DNA plasmidial superenovelado de *E. coli* ETEC H10407 foi obtido nas mesmas condições, exceto pelo tratamento com lisozima e utilizado como marcador de massa molecular (M). Os números acima das colunas correspondem às linhagens SDFs.

É possível perceber que existe uma diversidade significativa nos perfis plasmidiais das linhagens das quais foi possível extrair DNA plasmidial. Essa característica reforça a relevância desta análise e corrobora a diversidade encontrada em outras análises realizadas nesse estudo e pelo nosso grupo de pesquisas.

Um dos objetivos propostos nesse trabalho foi o isolamento de DNA plasmidial para complementar as informações a respeito da filogenia das linhagens SDF, mas a importância dessa análise na caracterização dessas linhagens é notável. Sendo assim, é essencial que novas técnicas para a lise de PC e obtenção de plasmídeos, principalmente os grandes plasmídeos, sejam testadas e aprimoradas para a adequação ao trabalho proposto.

5.2. Filogenia por rDNA 16S

5.2.1. Extração de DNA total

Inicialmente foi testado o método de extração de DNA total proposto por Cheng e Jiang (2006) que utiliza fenol como agente oxidante e dispensa o uso de detergentes para lisar as células. O método é bastante simples, de fácil manipulação e apresentou bom rendimento para algumas amostras. Porém, o resultado não foi satisfatório para todas as linhagens, pois não foi possível obter DNA da maioria, mesmo quando foi introduzido um pré-tratamento com lisozima.

O método de extração de DNA citado acima foi substituído. O DNA total foi obtido utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Mesmo que algumas amostras tivessem a PC lisada pela solução de digestão do *kit* foi feito um pré-tratamento com 4 mg/mL de lisozima em STE contendo sacarose em todas as amostras para padronizar a metodologia. Após o tratamento com lisozima, iniciou-se o protocolo de extração do *kit*, cujo primeiro passo é a digestão do envelope celular em uma solução contendo proteinase K e SDS. As células foram incubadas nessa solução por uma noite a 55 °C e o DNA total foi extraído e purificado dos protoplastos obtidos após a lise da PC. Para otimizar a produção de protoplastos das linhagens de interesse o meio indicado pelo fabricante (LB) foi substituído por BHI suplementado com L-treonina. O DNA obtido foi utilizado como molde para amplificação dos genes de rRNA 16S.

5.2.2. Amplificação e sequenciamento dos genes de rRNA 16S

O DNA total obtido das linhagens SDF selecionadas foi utilizado como molde para a amplificação dos genes de rRNA 16S por PCR utilizando os *primers* universais 27F e 1492R (Frank *et al.*, 2008).

Os produtos de PCR resultantes foram analisados em gel de agarose 1% e as bandas contendo fragmentos com tamanhos esperados (tipicamente, cerca de 1.600 pb) foram excisadas e purificadas do gel para o sequenciamento (Figura 10). Como pode ser observado na figura 10, a amplificação por PCR resultou em fragmentos de DNA com níveis de pureza, aparentemente, adequados para o sequenciamento, uma vez que apenas uma banda por gene de rRNA 16S pode ser observada, indicando que não houve amplificação inespecífica. Em adição, a quantidade de DNA molde para a reação de sequenciamento, parâmetro

extremamente crítico para a obtenção sequências com boa qualidade de resultado, também foi suficiente.

Ainda que todos os cuidados acima tenham sido adotados, parte do sequenciamento dos genes marcadores utilizados para a filogenia das linhagens SDF não resultou em sequências com qualidade adequada. Desta forma, 11 das 45 amostras selecionadas para esta análise: SDF0004; SDF0006; SDF0009; SDF0010; SDF0012; SDF0014; SDF0022; SDF0023; SDF0025; SDF0066 e SDF0101 não foram incluídas nos resultados. Em trabalhos futuros, novas preparações de DNA total, amplificação de genes de interesse e sequenciamento destas amostras serão realizados para inclusão nas análises filogenéticas.

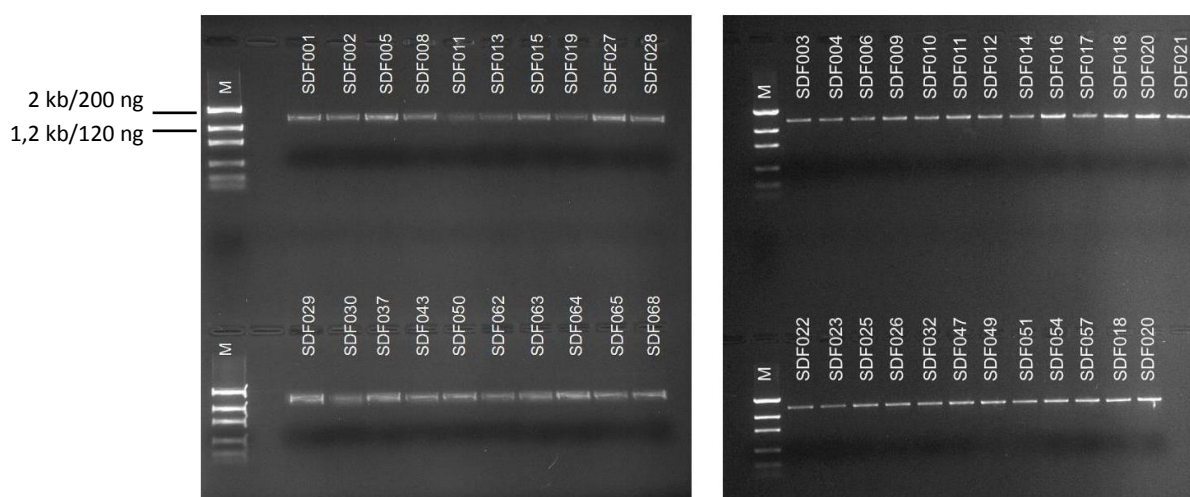


Figura 10. Análise do produto da amplificação de genes de rRNA 16S. O rDNA16S das linhagens SDF foi amplificado por PCR, analisado em gel de agarose 1%, em paralelo com o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (M; Invitrogen). O número acima de cada coluna indica a linhagem utilizada.

Para a identificação de *taxa* relacionados, as 34 sequências de genes rRNA 16S das linhagens SDF obtidas foram confrontadas com dois bancos de dados públicos *Genbank* e o RDP. A identificação desses genes utilizando os dados desses bancos forneceram resultados similares, descritos na tabela III. Para validar a identificação e obter a classificação mais provável dos diferentes *taxa*, as sequências ainda foram analisadas com a ferramenta *Classifier*, disponível no site do RDP (Tabela IV).

Duas linhagens — SDF00018 e SDF0049 — não apresentaram homologia com as sequências dos bancos de dados utilizadas para o alinhamento. Para estas sequências a análise realizada pelo *Classifier* determinou apenas o nível Domínio. Portanto novas preparações e sequenciamento devem ser realizados futuramente.

As linhagens SDF0005, SDF0019, SDF0037 e SDF0063 possuem um esporo esférico, com posição terminal e que deforma o esporângio (Tabela I). Estas características correspondem àquelas mencionadas na descrição do gênero *Lysinibacillus*, corroborando os resultados apresentados na tabela III. Em adição, os resultados obtidos em trabalhos paralelos (por MALDI-TOF) no LaBafes também indicam que a linhagem SDF0005 pertence ao gênero *Lysinibacillus*.

As linhagens membros do gênero *Paenibacillus* também apresentam esporos que deformam o esporângio, porém a morfologia é oval e a localização, geralmente, é central. Tais características foram observadas nas linhagens SDF0008 e SDF028 (Tabela I) e estão em concordância com os resultados das tabelas III e IV.

A linhagem SDF0030 apresentou uma estrutura semelhante a um cristal parasporal quando analisada em paralelo por MET, corroborando os dados do sequenciamento que apontaram uma alta identidade com *B. thuringiensis*. A espectrometria de massa, também, indica que esta é uma linhagem pertencente ao grupo do *B. cereus* e reforça estes resultados.

As linhagens SDF0021 e SDF0029 possuem alta identidade com *B. megaterium* e este resultado é corroborado pela morfologia dos esporos, observados por MET, e pela indicação do gênero, por MALDI-TOF. Porém, pela análise utilizando o *Classifier* só foi possível definir a classe para SDF0029 e a família para SDF0021.

A inconsistência entre a comparação da homologia de sequências dos genes marcadores e o aplicativo *Classifier* foi observada apenas para a linhagem SDF0057. O alinhamento de sequências aponta identidade de 89% com *B. megaterium*, entretanto, o *Classifier* aloca essa linhagem no gênero *Falsibacillus*.

A linhagem SDF0062 apresentou identidade com um gênero de bactérias Gram negativas pertencentes ao filo *Proteobacteria*. Como já mencionado, a habilidade de formar esporos está restrita aos membros do filo *Firmicutes*, portanto, novas preparações de DNA total e demais métodos serão repetidos para a classificação efetiva dessa linhagem.

As demais linhagens analisadas não mostraram características fenotípicas que pudessem ser utilizadas para corroborar a identificação e, por esta razão, estudos mais aprofundados são necessários para identifica-las.

Como pode ser observado, parte dos dados presentes nas Tabelas III e IV são consistentes com resultados obtidos por outras análises das linhagens SDF utilizadas neste estudo realizadas por nosso grupo de pesquisa, tais como, filoproteômica por espectrometria de massa (MALDI-TOF); ultraestrutura de esporos, por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e outras características fenotípicas. Entretanto, esses resultados preliminares ainda serão refinados incluindo novos marcadores moleculares em associação com análises de natureza fenotípica.

Tabela III. Identificação de linhagens SDF por comparação de sequências de genes de rRNA 16

Linhagem SDF	Gênero	Espécies de maior identidade (%)	Linhagem SDF	Gênero	Espécies de maior identidade (%)
0001	<i>Bacillus</i>	<i>B. safensis</i> (97)	0030	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> (97)
		<i>B. pumilus</i> (97)			<i>B. thuringiensis</i> (97)
		<i>B. stratosphericus</i> (97)	0032	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> (97)
0002	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i> (99)	0043	<i>Bacillus</i>	<i>B. safensis</i> (99)
		<i>B. safensis</i> (99)			<i>B. pumilus</i> (99)
		<i>B. subtilis</i> (99)			<i>B. stratosphericus</i> (99)
0005	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i> (96)	0047	<i>Bacillus</i>	<i>B. aerofilus</i> (99)
0008	<i>Paenibacillus</i>	<i>L. sphaericus</i> (96)			<i>B. altitudinis</i> (99)
		<i>P. alvei</i> (97)			<i>B. subtilis</i> (99)
0011	<i>Bacillus</i>	<i>P. apiarius</i> (94)	0050	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (98)
		<i>B. pumilus</i> (99)			<i>B. megaterium</i> (99)
0013	<i>Bacillus</i>	<i>B. stratosphericus</i> (99)	0051	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (98)
		<i>B. safensis</i> (97)			0054
0015	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i> (97)	0057	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (89)
0016	<i>Bacillus</i>	<i>B. oleronius</i> (97)	0062	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i> (96)
0017	<i>Bacillus</i>	<i>B. simplex</i> (98)	0063	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i> (95)
		<i>B. pumilus</i> (99)			<i>L. sphaericus</i> (95)
0019	<i>Lysinibacillus</i>	<i>B. safensis</i> (99)	0064	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (98)
		<i>L. fusiformis</i> (95)			<i>B. megaterium</i> (99)
0020	<i>Brevibacillus</i>	<i>L. sphaericus</i> (95)	0065	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (99)
0021	<i>Bacillus</i>	<i>B. laterosporus</i>	0068	<i>Bacillus</i>	<i>B. simplex</i> (98)
0027	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (98)	0100	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> (99)
		<i>B. safensis</i> (97)			<i>B. thuringiensis</i> (99)
0028	<i>Paenibacillus</i>	<i>B. pumilus</i> (97)	0018	Sem homologia	<i>B. weihenstephanensis</i> (99)
		<i>P. alvei</i> (97)			
0029	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (93)	0049		

Tabela IV. Classificação de linhagens SDF utilizadas neste estudo por genes rRNA 16S

Linhagem SDF	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	
0029	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	ND	ND	ND	
0001						
0013						
0027						
0047						
0030						
0015						
0019						
0021						
0032						
0051						
0001			<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	
0003						
0011						
0016						
0017						
0043						
0050						
0054						
0064						
0065						
0068						
0100						
0057						<i>Falsibacillus</i>
0005						<i>Lysinibacillus</i>
0037						
0063						
0020	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus</i>				
0008		<i>Paenibacillus</i>				
0028						
0062	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	

ND: não determinado

5.2.3. Construção das árvores filogenéticas

Para a análise filogenética proposta neste trabalho foram incluídas, inicialmente, sequências de referência de genes de rRNA 16S de espécies dos gêneros aeróbios *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* e do gênero anaeróbio *Clostridium*, como membro externo, obtidas no GenBank (Tabela V). Essas sequências foram escolhidas com base nos resultados obtidos com a ferramenta *Classifier* (Tabela IV).

Inicialmente, para a construção da árvore filogenética foram utilizadas as ferramentas de alinhamento ClustalX e o programa para construção de árvores MEGA 5.0. A árvore obtida com esses dois programas não foi consistente com os dados mostrados nas tabelas III e IV (Figura 11). O principal exemplo da inconsistência observada nesta árvore é o agrupamento das sequências de microrganismos conhecidos e que pertencem a gêneros diferentes. Os métodos utilizados agruparam *P. polymyxa*, *B. cereus*, *B. megaterium* e *L. sphaericus* e alocaram *B. subtilis* em um ramo separado. Essa inconsistência foi observada mesmo com a utilização de outros métodos de construção de árvore — máxima parcimônia e *neighbor joining* — por isso as ferramentas de construção e representação gráfica da árvore foram substituídas pelas ferramentas descritas a seguir.

Tabela V. Espécies usadas como referência nas análises filogenéticas

Espécie	Número de acesso*
<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1
<i>Bacillus megaterium</i>	KC443085.1
<i>Bacillus pumilus</i>	EU350371.1
<i>Bacillus safensis</i>	KJ427751.1
<i>Bacillus subtilis</i>	NR_102783.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KC121063.1
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	NR_024697.1
<i>Brevibacillus agri</i>	AY319301
<i>Clostridium clariflavum</i>	NR_041235.1
<i>Falsibacillus pallidus</i>	EU364818
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	EU855791.1
<i>Paenibacillus alvei</i>	JX437031.1
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NR_103922.1

* GenBank.

Após a inconsistência da árvore obtida com o MEGA foi testado o método disponível no sítio www.phylogeny.fr. Este sítio disponibiliza as ferramentas de alinhamento ClustalW e

MUSCLE. Após o alinhamento existe a opção de curar as sequências com a ferramenta GBlocks. Independente da ferramenta de alinhamento e da utilização do recurso de normalização com o GBlocks as árvores resultantes foram semelhantes. O método disponível para a construção da árvore é o método da máxima verossimilhança, utilizando o algoritmo PhyML. A representação gráfica da árvore é realizada pelo programa TreeDyn. Para gerar uma árvore consenso com 100 réplicas foi aplicada a análise *bootstrap*.

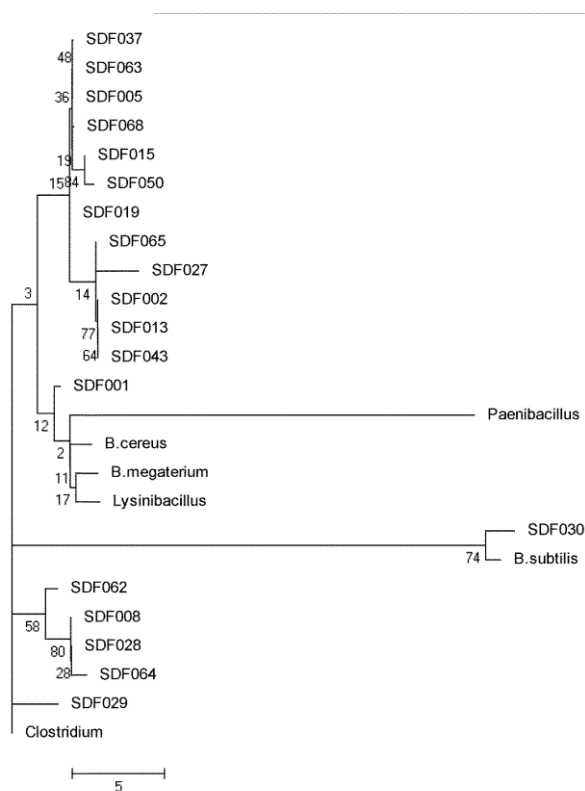


Figura 11. Árvore filogenética inconsistente. As sequências foram alinhadas pelo ClustalX, as árvores foram construídas pelo MEGA 5.0 pelo método de máxima verossimilhança após a análise *bootstrap* com 100 réplicas.

Como pode ser observado na tabela IV as linhagens SDF0020 e SDF0057 foram classificadas como espécies dos gêneros *Brevibacillus* e *Falsibacillus*, respectivamente. Por essa razão foram incluídas sequências de genes de rRNA 16S de espécies tipo destes gêneros na análise obtidas no GenBank (Tabela V). As linhagens SDF0018 e SDF0049 foram incluídas na análise, mesmo que as respectivas sequências dos genes de interesse não tenham

apresentado identidade com outras sequências disponíveis nos bancos de dados. A árvore filogenética resultante está representada na figura 12.

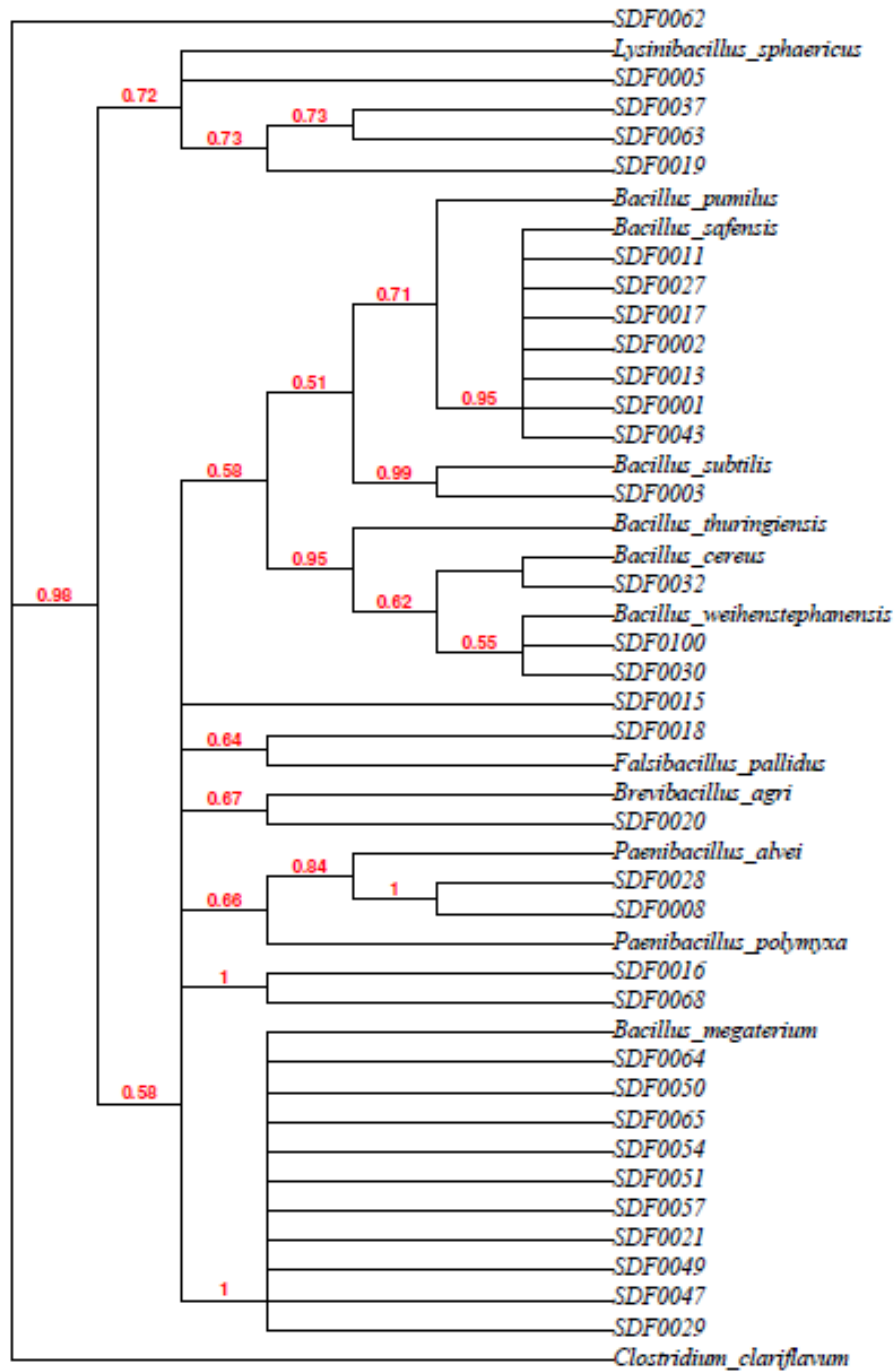


Figura 12. Árvore filogenética. As relações filogenéticas foram estabelecidas pelo método de máxima verossimilhança. As sequências alinhadas com o ClustalW foram normatizadas com o GBlocks e a representação gráfica foi produzida com a utilização do TreeDyn, após a análise *Bootstrap* com 100 réplicas.

Esse método se mostrou consistente com os dados obtidos após identificação das sequências, além de ser de utilização extremamente simples e intuitiva. Por esses motivos o método foi eleito para dar continuidade às análises aqui propostas.

As linhagens cuja comparação de sequências mostrou identidade com sequências de *B. megaterium* estão agrupadas conforme a sub-árvore ilustrada na figura 13. Anteriormente foi mencionada a inconsistência entre os dados das tabelas III e IV, quanto à linhagem SDF0057. Na análise filogenética, os métodos utilizados agrupam esta linhagem com aquelas que apresentaram maior identidade com *B. megaterium*. Portanto, a análise filogenética é consistente com os dados da tabela III.

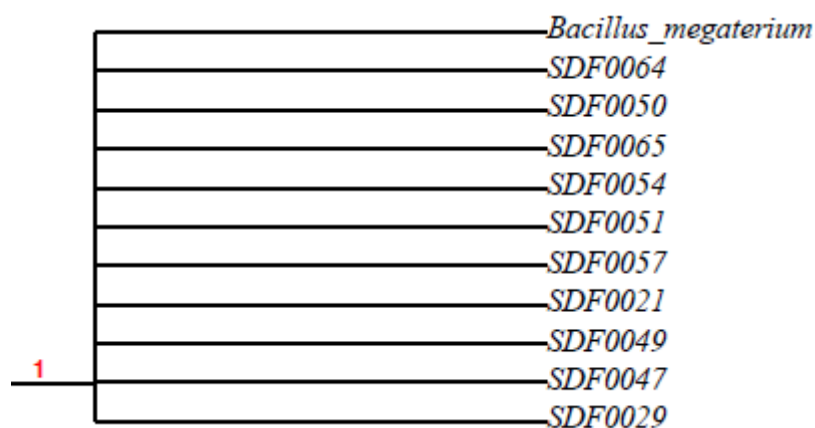


Figura 13. Filogenia de linhagens SDF. Detalhe de árvore filogenética agrupando *B. megaterium* e linhagens relacionadas.

A análise filogenética também foi consistente com os dados das tabelas III e IV para espécies relacionadas ao *B. subtilis* (Figura 14), ao *B. cereus* (Figura 15), ao *L. sphaericus* (Figura 16) e a espécies do gênero *Paenibacillus* (Figura 17).

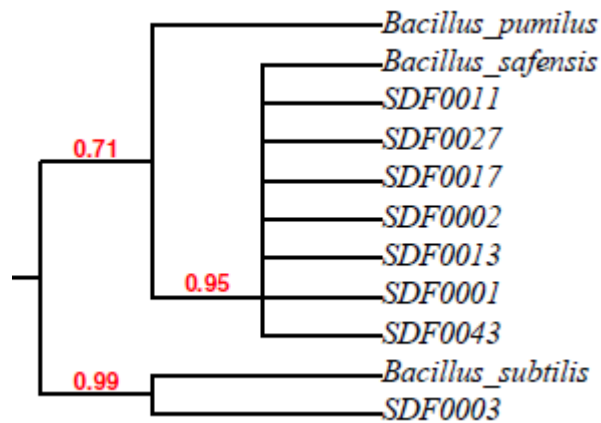


Figura 14. Filogenia de linhagens SDF. Detalhe de árvore filogenética agrupando *B. subtilis* e linhagens relacionadas.

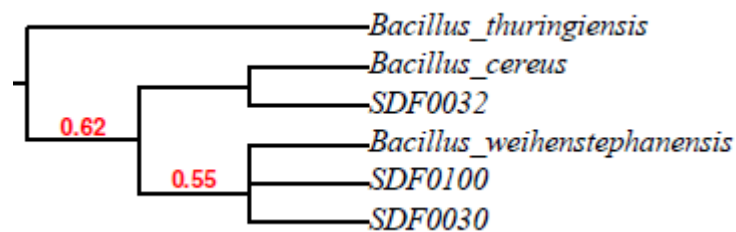


Figura 15. Filogenia de linhagens SDF. Detalhe de árvore filogenética agrupando *B. cereus* e linhagens relacionadas.

O que pode ser observado a partir da árvore da figura 7 que, em uma pequena amostragem das Bafes de solo, já existe grande diversidade de linhagens. Tal diversidade é corroborada por filoproteômica por MALDI-TOF e MET realizados pelo nosso grupo (De-Souza, com. pessoal). Essas análises preliminares de linhagens selecionadas da CBafes mostram grande potencial para o estudo desses microrganismos.

É importante observar que filotipos não classificados no nível de gênero representavam proporção significativa dos resultados (33%) para as unidades taxonômicas analisadas neste trabalho, ressaltando a necessidade de uma maior diversidade de espécies de referência existentes em bancos de dados.

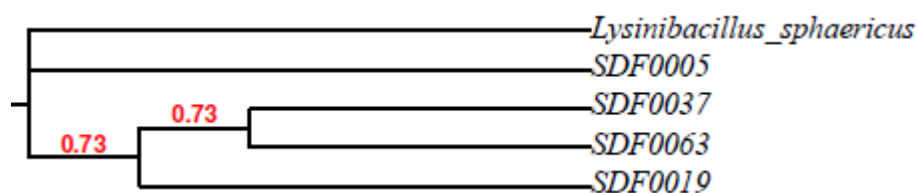


Figura 16. Filogenia de linhagens SDF. Detalhe de árvore filogenética agrupando *L. sphaericus* e linhagens relacionadas.

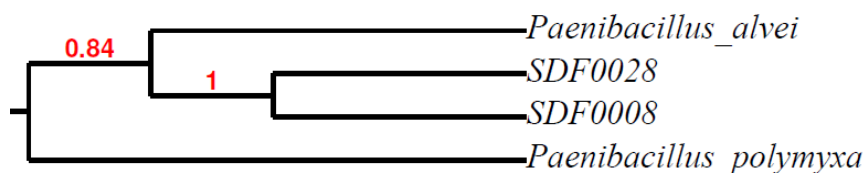


Figura 17. Filogenia de linhagens SDF. Detalhe de árvore filogenética agrupando linhagens relacionadas ao gênero *Paenibacillus*.

Existem diversos estudos que avaliam a estrutura de comunidades de solo. Este trabalho, em particular, não teve o objetivo de avaliar a estrutura principalmente devido aos vieses que podem surgir em estudos dependentes de cultura. Sabe-se que em abordagens desse tipo o crescimento de alguns organismos pode se sobrepor ao crescimento de outros, portanto alguns grupos podem ser sub ou super representados.

É sabido que em abordagens dependentes de cultura apenas 0,1 a 1% das bactérias presentes em uma amostra são acessíveis (Zhang e Xu, 2008; Janssen, 2006). Quando essas abordagens são utilizadas os membros do filo *Firmicutes* observados são mais abundantes. Porém essa representação é drasticamente diminuída quando são utilizadas abordagens moleculares.

Estudos de diversidade independentes de cultura mostram que o solo exibe uma estrutura de comunidade estável. A maioria dos clones de bibliotecas construídas a partir da amplificação de genes de rRNA 16S de amostras de solo pertence a nove filos principais: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Plantomycetes*, *Verrumicrobia*, e *Gemmatimonadetes* (Youssef e Elshaned, 2009; Zhang e Xu, 2008; Janssen, 2006). Essa estabilidade é notável, considerando as variações existentes no solo de diferentes locais de coleta de amostras.

Em um trabalho de 2006, Janssen fez uma análise de 32 bibliotecas construídas a partir da amplificação de genes de rRNA 16S de amostras de solo coletadas em diversos países. O filo *Firmicutes* representava, em média, 2% da composição das bibliotecas analisadas, sendo

os gêneros *Bacillus* e *Clostridia* os que tinham maior representatividade. Essa baixa abundância de membro do filo é reproduzida por outros estudos de avaliação de diversidade de solos.

Em 2009 Youssef e Elshaned apresentaram resultados da construção de cinco grandes bibliotecas de clones e analisaram tanto a abundância dos membros dos filios mais representativos, quanto a diversidade desses membros. Em concordância com outros estudos de diversidade bacteriana em solos, os autores observaram a baixa abundância dos membros do filo *Firmicutes* nas amostras, mas por outro lado, esse filo era o que apresentava maior diversidade de microrganismos. Já foi postulado que como cada espécie utiliza recursos diferentes e ocupa nichos distintos na comunidade, portanto, as comunidades mais diversas apresentam maior contribuição ao ecossistema (Bell *et al*, 2005; Giovannoni, 2004; Loreau e Hector, 2001). Essa mesma ideia pode ser extrapolada para linhagens com maior diversidade, como é o caso dos membros do filo *Firmicutes*, e ilustra a importância do grupo para a manutenção das comunidades microbianas do solo.

Por outro lado, a baixa abundância dos membros do filo *Firmicutes* em bibliotecas construídas com base na amplificação de rRNA 16S se dá pela dificuldade em lisar células vegetativas e esporos (Youssef e Elshaned, 2009; Janssen, 2006). Por esse motivo, os membros do filo são pouco detectados em análises baseadas em amplificação de DNA extraído diretamente do solo. Além disso, muitas sequências assinaladas no filo *Firmicutes* não podem ser assinaladas em gêneros conhecidos, isso mostra a necessidade do isolamento e identificação de novas amostras (Zhang e Xu, 2008; Janssen, 2006).

Pelas razões já mencionadas é necessária uma expansão de estudos de caracterização de membros do filo *Firmicutes* para ampliar o conhecimento básico sobre esses microrganismos e o número de sequências depositadas em bancos de dados para que estes forneçam mais dados para outros estudos de avaliação de diversidade das comunidades microbianas.

7. Conclusão e perspectivas

Neste trabalho foi avaliada a diversidade das linhagens SDF de Bafes isoladas do solo do DF por genes de rRNA 16S e foram ainda estabelecidas as relações filogenéticas entre as sequências desses genes. O perfil plasmidial dessas linhagens também foi avaliado.

A principal dificuldade encontrada durante a realização deste trabalho foi a obtenção de protoplastos. As espécies do filo *Firmicutes* apresentam PC muito rígida devido ao alto número de camadas de peptidoglicano. Alguns organismos ainda apresentam modificações estruturais na PC que os torna resistente à ação da lisozima. Para otimizar os resultados aqui apresentados é necessário buscar enzimas alternativas, com atividades diferentes da lisozima, para acessar o conteúdo genético das linhagens de interesse. Quando se trata de extração de DNA plasmidial, a lise da PC precisa ser altamente controlada, portanto alternativas à lisozima são essenciais nesse ponto do trabalho.

Os resultados obtidos mostram que existe uma grande diversidade entre as linhagens da Cbafes analisadas neste trabalho. Esses resultados são corroborados por outros dados obtidos pelo nosso grupo, utilizando técnicas diferentes (MET e MALDI-TOF), o que demonstra o potencial da associação desses métodos para classificação das linhagens SDFs. Entretanto existe ainda a necessidade de otimizar a metodologia, para isso serão realizadas novas buscas por técnicas mais eficientes e, preferencialmente, de baixo custo viabilizar a extensão das análises para todas as linhagens da Coleção.

Futuramente as análises realizadas neste trabalho serão estendidas a todas as linhagens da Cbafes, e serão ainda refinadas pela adição de genes de expressão constitutiva para análises filogenéticas.

8. Referências bibliográficas

- Abriouel, H.; Omar, N.B.; Lucas, R.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A. 2006. **Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural genes in enterococci isolated from food sources.** Letters in Applied Microbiology, 42: 331-337.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T. 2007. **Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 1117-1125.
- Andrup, L.; Barford, K.K.; Jensen, G.B.; Smidt, L. 2008. **Detection of large plasmids from the *Bacillus cereus* group.** Plasmid, 59: 139-143.
- Baltrus, D.A. **Exploring the costs of horizontal gene transfer.** Trends in Ecology and Evolution, 28(8): 489-495.
- Banat, I.M.; Marchant, R. 2011. ***Geobacillus* Activities in Soil and Oil Contamination Remediation.** Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed.
- Baker, C.G., Smith, J.J., Cowan, D.A. 2003. **Review and re-analysis of domain-specific 16S primers.** Journal of Microbiological Methods, 55: 541-555.
- Barák, I., Ricca, E., Cutting, M.S. 2005. **From fundamental studies of sporulation to applied spore research.** Molecular Microbiology, 55(2): 330-338.
- Bell, T.; Newman, J.A.; Silverman, B.W.; Turner, S.L.; Lilley, A.K. 2005. **The contribution of species richness and composition to bacterial services.** Nature, 436: 1157-1160.
- Bera, A.; Biswas, R.; Herbert, S.; Kulauzovic, E.; Weidenmaier, C.; Peschel, A.; Götz, F. 2007. **Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus*.** Journal of Bacteriology, 189(1): 280-283.
- Bosco, K.J.; Kaddu-Mulindwa, D.H.; Assimwe, B.B. 2012. **Antimicrobial drug resistance and plasmid profile of *Salmonella* isolates from humans and foods of animal origin in Uganda.** Advances in infectious diseases, 2: 151-155.
- Bouma, J.E.; Lenski, R.E. 1988. **Evolution of a bacteria/plasmid association.** Nature, 335: 351-352.
- Buso, G.S.C. 2005. **Marcadores moleculares e análise filogenética.** Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p.

- Cano, R.J., Borucki, M.K. 1995. **Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber.** *Science*, 268(5213):1060-4.
- Chassy, B.M. 1976. **A gentle method for the lysis of oral streptococci.** *Biochemical and biophysical research communications*, 68(2): 603-608.
- Cheng, H.-R., Jiang, N. 2006. **Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts.** *Biotechnology Letters*, 28: 55-59.
- Clarridge III, J.E. 2004. **Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases.** *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4): 840-862.
- Cohan, F.M. 2006. **Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution.** *Philosophical transactions of the Royal Society Biological sciences*, 1475(361): 1985-1996.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. 2009. **The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis.** *Nucleic acids research*, 37: D141-D145.
- Crossman, LC.; Chaudhuri, R.R.; Beatson, S.A.; Wells, T.J.; Desvaux, M.; Cunningham, A.F.; Petty, N.K.; Mahon, V.; Brinkley, C.; Hobman, J.L.; Savarino, S.J.; Turner, S.M.; *et al.* 2010. **A commensal gone bad.** *Journal of Bacteriology*, 192(21): 5822-5831.
- Cutting, S., Oke, V., Driks, A., Losick, R., Lu, S., Krooa, L. 1990. **A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *B. subtilis*.** *Cell*, 62: 239-250.
- Dagan, T. 2011. **Phylogenomics networks.** *Trends in Microbiology*, 19(10). 483-491.
- Dahllöf, I.; Baillie, H.; Kjellerberg, S. 2000. ***rpoB*-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity.** *Applied Environmental Microbiology*, 66(8). 3376-3380.
- de Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B. (Eds.). 2009. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes.** Second Ed.
- Driks, A. 1999. ***Bacillus subtilis* spore coat.** *Microbiology and molecular Biology Reviews*, 63(1): 1-20.
- Driks, A. 2003. **The dynamic spore.** *PNAS*, 100(6): 3007-3009.
- Dubnau, D.; Smith, I; Morell, P.; Marmur, J. 1965. **Gene conservation in *Bacillus* species, I. conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies.** *PNAS*, 54(2): 491-498.

- Ehling-Schulz, M.; Messelhäuser, U. 2013. **Bacillus “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling.** *Frontiers in Microbiology*, 4: 1-8.
- Eijlander, R.T.; de Jong, A.; Krawczyk, A.O.; Holsappel, S.; Kuipers, O.P. 2014. **SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*.** *Nucleic Acid Research*, 42: 685-691.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaun, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J. 2008. **Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes.** *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8): 2461-2470.
- Fritze, D. 2004. **Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria.** *Phytopathology*, 94(11). 1245-1248.
- Fujita, M., Losick, R. 2003. **The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division.** *Genes and development*, 17: 1166-1174.
- Funnel, B.E.; Phillips, G. (Eds.).2004. **Plasmid Biology.** ASM Press. Washington, 1a. Ed.
- Galperin, M.Y. 2013. **Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*.** *Microbiology Spectrum*, 1(2): 1-15.
- Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Lilburn, T.G. 2003. **Taxonomic outline of the prokaryotes.** In: *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, 2nd edn release 4.0 DOI 10.1007/bergeysoutline200310
- Gardener, B.B.M. 2004. **Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In Agricultural Systems.** *Phytopathology*, 94(11). 1252-1258.
- Giovannoni, S. 2004. **Oceans of bacteria.** *Nature*, 430: 515-516.
- Grauman, P.L., Losick, R. 2001. **Coupling of asymmetric division to polar placement of replication origin regions in *Bacillus subtilis*.** *Journal of Bacteriology*, 183(13): 4052-4060.
- Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M. 2003. **Conjugative plasmid transfer in Gram positive Bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2): 277-301.
- Grossman, A.D., Losick, R. 1988. **Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*.** *PNAS*, 85: 4369-4373.
- Guindon, S.; Gascuel, O. 2006. **A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood.** *Systematic Biology*, 52(5): 696-704.
- Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., Sarrau, B. de, Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P.E., Lereclus, D., Vos, P., Nguyen-The, C.,

- Sorokin, A. 2012. ***Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
- Haldenwang, W.G. 1995. **The Sigma Factors of *Bacillus subtilis*.** Microbiological Reviews, 59(1): 1-30.
- Hernandez, E.; Ramisse, F.; Ducoureau, J.-P.; Cruel, T.; Cavallo, J.-D. 1998. ***Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (Serotype H34) Superinfection: Case Report and Experimental Evidence of Pathogenicity in Immunosuppressed Mice.** Journal of clinical microbiology, 36(7): 2138-2139.
- Hilbert, D.W., Piggot, P.J. 2004. **Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation.** Microbiology and Molecular Biology reviews, 68(2): 234-262.
- Hoffmaster, A.R.; Ravel, J.; Rasko, D.A.; Chapman, G.D.; Chute, M.D.; Marston, C.K.; De, B.K.; Sacchi, C.T.; Fitzgerald, C.; Mayer, L.W.; Maiden, M.C.; Priest, F.G.; Barker, M.; Jiang, L.; Cer, R.Z.; Rilstone, J.; Peterson, S.N.; Weyant, R.S.; Galloway, T.D.; Read, T.; Popovic, T.; Fraser, C.M. 2004. **Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax.** PNAS, 101: 8449-8454.
- Hong, H.A.; Fakhry, S.; Baccigalupi, L.; Ricca, E.; Cutting, S.M. 2009. **Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers.** Research in Microbiology **160**, 375-379.
- Hong, H.A.; Duc, L.H.; Cutting, S.M. 2005. **The use of bacterial spores formers as probiotics.** FEMS, 29(4): 813-835.
- Hu, X.; Mahillon, J. 2004. **Life Cycle and Gene Exchange.** Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed.
- Janssen, P.H. 2006. **Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes.** Applied and Environmental Microbiology, 72(3): 1719-1728.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eillenbergh, J., Mahillon, J. 2003. **The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives.** Environmental Microbiology, 5(8): 631-640.
- Jeyaram, K.; Romi, W.; Singh, T.A.; Adewumi, G.A.; Basanti, K.; Oguntoyinbo, F.A. 2011. **Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance.** Journal of microbiological methods, 87(2): 161-164.
- Jiménez, G.; Urdiain, M.; Cifuentes, A.; López-López, A.; Blanch, A.R.; Tamames, J.; Kämpfer, P.; Kølsto, A.-B.; Ramón, D.; Martínez, J.F.; Codoñer, F.M.; Rosselló-Móra, R. 2013. **Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus***

- group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations.** Systematic and Applied Microbiology, 36(6): 383-391.
- Joung, K.-B., Côté, J.-C. 2001. **Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphisms.** Journal of applied microbiology, 90: 115-122.
- Kloepper, J.W.; Ryu, C.-M.; Zhang, S. 2004. **Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp.** Phytopatology, 94(11): 1259-1266.
- Kølsto, A.-B., Tourasse, N.J., Okstad, O.A. 2009. **What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?** Annual reviews microbiology, 63: 451-476.
- Kozasa, M.; Wake, M.; Azuma, R. 1977. **Taxonomic studies on *Bacillus cereus* T-7112-Biotype.** Journal of Tokyo Veterinary and Zootechnology Sciences, 25: 38.
- La Duc, M.; Satomi, M.; Venkateswaran, K. 2004. ***Bacillus odysseyi* sp. nov., a round-spore-forming bacillus isolated from the Mars Odyssey spacecraft.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 195-201.
- Lederberg, J. 1997. **Personal Perspective: Plasmid (1952-1997).** Plasmid 39, 1-9.
- Lederberg, J. 1952. **Cell genetics and hereditary symbiosis.** Physiological reviews, 32(4): 403-430.
- Lereclus, D., Lecadet, M.-M.; Ribies, J.; Dedonder, R. 1982. **Molecular Relationships Among Plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved Sequences Through 11 Crystalliferous Strains.** Molecular Genetics and Genomics, 186: 391-398.
- Llosa, M.; de la Cruz, F. 2005. **Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering.** Research in Microbiology 156, 1-6.
- Logan, N. A.; de Vos, P. (Eds.). 2011. **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed.
- Logan, N.A.; Berge, O.; Bishop, A. H.; Busse, H. J.; de Vos, P.; Fritze, D.; Heyndrickx, M. R. A.; Kämpfer, P.; Rabinovitch, L.; Salkinoja-Salonen, M.S.; Seldin, L.; Ventosa, A. (2009). **Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria.** Int J Syst Evol Microbiol 59, 2114-2121.
- Logan, N.A.; Halket, G. 2011. **Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria.** Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed.
- Loreau, M.; Hector, A. 2001. **Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments.** Nature, 412: 72-76.
- Ludwig, W. 2007. Reprint of “**Nucleic acid techniques in bacterial systematic and identification**” [Int. J. Food. Microbiol., 120 (2007) 225-236]. International Journal of Food Microbiology, 125: I-XIII.

- Lugtenberg, B.; Kamilova, F. 2009. **Plant-growth promoting rhizobacteria**. Annual review microbiology, 63: 541-556.
- Mandic-Mulec, I.; Prosser, J.I. 2011. **Diversity of Endospore-forming Bacteria in Soil: Characterization and Driving Mechanisms**. Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria**. Springer, 1^a. Ed.
- Maughan, H.; Van der Auwera, G. 2011. **Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading**. Infection, Genetics and Evolution, 11: 789-797.
- McKenney, P.T., Driks, A.; Eichenberger, P. 2013. **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat**. Nature Reviews Microbiology, 11: 33-34.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eskandrian, H.A., Grabowski, P., Guberman, J., Wang, K.H., Gitai, Z., Eichenberger, P. 2010. **A distance weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat**. Current Biology:20, 934—938.
- Mertens, K.; Freund, L.; Schmook, G.; Hänsel, C.; Melzer, F.; Elschner, M.C. 2014. **Comparative evaluation of eleven commercial DNA extraction kits for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* spores in spiked dairy samples**. International Journal of Food Microbiology, 170: 29-37.
- Moeller, R.; Raguse, M.; Reitz, G.; Okayasu, R.; Li, Z.; Klein, S.; Setlow, P.; Nicholson, W.L. 2014. **Resistance of *Bacillus subtilis* Spore DNA to Lethal Ionizing Radiation Damage Relies Primarily on Spore Core Components and DNA Repair, with Minor Effects of Oxygen Radical Detoxification**. Applied and Environmental Microbiology, 80(1): 104-109.
- Mount, D. H. 2008. **Choosing a method for phylogenetic prediction**. Cold Spring Harbor Protocols, 3(4).
- Mount, D.M. 2004. **Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis**. Cold Spring Harbor Press, Nova Iorque, 2a. Ed.
- Moura, A.; Oliveira, C.; Henriques, I.; Smalla, K.; Correia, A. 2012. **Broad diversity of conjugative plasmids in integron-carrying bacteria from wastewater environments**. FEMS Microbiology letters, 330: 157-164.
- Nam, Y.-D.; Seo, M.-J.; Lim, S.-I.; Lee, S.-Y. 2012. **Genome Sequence of *Lysinibacillus boronitolerans* F1182, Isolated from a Traditional Korean Fermented Soybean Product**. Journal of Bacteriology, 194(21): 5988.

- Ohba, M., Mizuki, E., Uemori, A. 2009. **Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis***. *Anticancer Research*, 29: 427-434.
- Papazisi, L., Rasko, D.A., Ratnayake, S., Bock, G.R., et. al. 2011. **Investigating the genome diversity of *B. cereus* and evolutionary aspects of *B. anthracis* emergence**. *Genomics*, 98: 26-39.
- Park, S., Rittman, B.E., Bae, W. 2009. **Life-cycle kinetic model for endospore-forming bacteria, including germination and sporulation**. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(5): 1012-1024.
- Pérez-García, A.; Romero, D.; Zeriuoh, H.; de Vicente, A. 2011. **Biological Control of Phytopathogenic Fungi by Aerobic Endospore-Formers**. Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria**. Springer, 1^a. Ed.
- Phelps, R.J.; McKillip, J.L. 2002. **Enterotoxin Production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group**. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6). 3147-3151.
- Phillips, Z.E.V.; Strauch, M.A. 2002. ***Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression**. *Cellular and molecular life sciences*, 59: 392-402.
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W. 2004. **Sporulation of *Bacillus subtilis***. *Current opinion in Microbiology*, 7: 579-586.
- Polanski, A.; Kimmel, M. 2007. **Bioinformatics**. Springer, Berlin. 1a. Ed.
- Polz, M.F.; Alm, E.J.; Hanage, W.P. 2013. **Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure**. *Trends in Genetics*, 29(3): 170-175.
- Praszkier, J., Pittard, A.J. 2005. **Control of replication in I-complex plasmids**. *Plasmid*, 53: 97-112.
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. 2011. **Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond**. *Microbiological Research*, 166: 99-110.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Okstad, O.A., et. al. 2007. **Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1**. *Journal of Bacteriology*, 189(1): 52-64.
- Rasmus; S. Mikkola, R.; Andersson, M.; Teplova, V.V.; Venediktova, N.; Ekkommonen, C.; et al. 2012. **Psychrotolerant *Paenibacillus tundrae* isolates from barley grains produce new cereulide-like depsipeptides (paenilidae and homopaenilide) that are highly toxic to mammalian cells**. *Applied and Environmental Microbiology*, 78. 3732-3743.

- Reva, O. N.; Sorokulova, I. B.; Smirnov, V.V. 2001. **Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype.** *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1361-1371.
- Reyes-Ramírez, A.; Ibarra, J.E. 2008. **Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Type Strains.** *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(1): 125-129.
- Rood, J.I. 2004. **Virulence plasmids of spore-forming bacteria.** Em: **Plasmid Biology.** ASM Press. Washington, 1a. Ed.
- Rosso, M.-L., Vary, P.S. 2005. **Distribution of *Bacillus megaterium* QM B1551 plasmids among other *B. megaterium* strains and *Bacillus* species.** *Plasmid*, **53**: 205-217.
- Royet, J.; Dziarski, R. 2007. **Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences.** *Nature Reviews*, **5**(4): 264-277.
- Ruiz-Lozano, J.M.; Azcón, R. 2011. ***Brevibacillus*, Arbuscular Mycorrhizae and Remediation of Metal Toxicity in Agricultural Soils.** Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed.
- Sansinenea, E., Ortiz, A. 2011. **Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp.** *Biotechnology Letters*, **33**: 1523-1538.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. 1998. ***Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(3): 775-806.
- Setlow, P. 2007. **I will survive: DNA protection in bacterial spores.** *Trends in Microbiology*, **15**(4): 172-180.
- Silva, R.F.; Mendonça, S.C.M.; Carvalho, L.M.; Reis, A.M.; Gordo, I.; Trindade, S.; Dionisio, F. 2011. **Pervasive Sign Epistasis between Conjugative Plasmids and Drug-Resistance Chromosomal Mutations.** *Plos Genetics*, **7**(7): 1-10.
- Streshinskaya, G.M.; Shashkov, A.S.; Pothechina, N.V.; Kozlova, Y.I.; Tul'skaya, E.M.; Senchenkova, S.N.; Kudryashova, E.B.; Anan'ina, L.N. 2011. **Carbohydrate-Containing Cell Wall Polymers of some Strains of the *Bacillus Subtilis* Group.** *Microbiology*, **80**(1). 21-29.
- Strominger, J.L.; Ghuyssen, J.M. 1967. **On the linkage between teichoic acid and the glycopeptide in the cell wall of *Staphylococcus aureus*.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**:418-424.
- Thomas, C. M. 2000. **Paradigms of plasmid organization.** *Molecular Microbiology* **37**(3), 485-491.

- Tourasse, N.J., Helgason, E., Okstad, O.A., Hegna, I.K., Kølsto, A.-B. 2006. **The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics.** Journal of Applied Microbiology, 101: 579-593.
- Van der Auwera G.; Feldgarden, M.; Kolter, R.; Mahillon, J. 2013. **Whole-genome sequences of 94 environmental isolates of *Bacillus cereus* sensu lato.** Genome Announc.1(5):e00380-13. doi:10.1128/genomeA.00380-13.
- Van der Auwera, G.; Mahillon, J. 2008. **Transcriptional analysis of the conjugative plasmid pAW63 from *Bacillus thuringiensis*.** Plasmid, 60: 190-199.
- Van der Auwera, G., Timmerly, S., Hoton, F., Mahillon, J. 2007. **Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs.** International Journal of Food Microbiology, 113: 164-172.
- Verbaendert, I.; de Vos, P. 2011. **Studying Denitrification by Aerobic Endospore-forming Bacteria in Soil.** Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria.** Springer, 1^a. Ed.
- Villas-Bôas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N. 2007. **Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*.** Canadian Journal of Microbiology, 53: 673-687.
- Vinje, H.; Almoy, T.; Liland, K.H.; Snipen, L. 2014. **A systematic search for discriminating sites in the 16S ribosomal RNA gene.** Microbial Informatics and Experimentation, 4(2): 1-9.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., Powers, D.W. 2000. **Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal.** Nature, 407(6806):897-900.
- Wang, C.-C.; Chu, M.-L.; Ho, L.-J.; Hwang, R.-C. 1991. **Analysis of plasmid pattern in paediatric intensive care unit outbreaks of nosocomial infection due to *Enterobacter cloacae*.** Journal of hospital infection, 19: 33-40.
- Wang, L.-T.; Lee, F.-L.; Tai, C.-J.; Kasai, H. 2007. **Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA—DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **57**. 1846—1850.
- Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. 2007. **Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy.** Applied and Environmental Microbiology (73) 16: 5261-5267.
- Wattiau, P.; Renard, M.-E.; Ledent, P.; Debois, V., Blackman, G., Agathos, S.N. 2001. **A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its applications to**

- the monitoring of wastewater biotreatment.** Applied Microbiology and Biotechnology, **56.** 816-819.
- Wegrzyn, G. 2005. **What does “plasmid biology” currently mean?** Summary of the Plasmid Biology 2004 Meeting. Plasmid, 53: 14-22.
- Westmacott, D., Perkins, H.R. 1979. **Effects of Lysozyme on *Bacillus cereus* 569: rupture of chains of bacteria and enhancement of sensitivity to autolysins.** Journal of General Microbiology, 115: 1-11.
- Wilcks, A.; Jayaswal, N.; Lereclus, D.; Andrup, L. 1998. **Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73.** Microbiology, 144(5): 1263-1270.
- Woese, C.R. 2000. **Interpreting the universal phylogenetic tree.** PNAS, 97(15): 8392-8396.
- Woese, C.R. 1987. **Bacterial Evolution.** Microbial and Molecular Biology Reviews, 51(2): 221-271.
- Xu, D.; Côté, J.-C. 2003. **Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53. 695-704.
- Youssef, N.H.; Elshahed, M.S. 2009. **Diversity rankings among bacterial lineages in soil.** The ISME Journal, 3: 305-313.
- Zhang, L.; Xu, Z. 2008. **Assessing bacterial diversity in soil.** Journal of soils and sediments, 8: 379-388.
- Zuccarelli, A.J.; Roy, I.; Harding, G.P.; Couperus, J.J. 1990. **Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Journal of clinical Microbiology, 28(1): 97-102.