



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

**Diversidades funcional e filogenética de Bactérias
aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo**

Juliana Capella de Orem

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza

Brasília, DF, 2018



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

Diversidades funcional e filogenética de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutora em Biologia Microbiana.

Juliana Capella de Orem

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza

Brasília, DF, 2018

Agradecimentos

Agradeço sempre o apoio incondicional da minha família. Agradeço ao meu esposo, Luiz Augusto, meu maior incentivador e o melhor parceiro da vida. Minha mãe, Cláudia, e minha vó, Lecy, merecem um capítulo inteiro de agradecimentos: todas as palavras do mundo não seriam suficientes para agradecer-las por tudo.

Agradeço aos meus amigos maravilhosos que deixam a vida mais leve e divertida e aos meus compadres por estarem sempre perto.

Agradeço aos meus amigos do LaBafes: Maria Inês, Danilo e Paulo Henrique. Não poderia escolher melhores companheiros de trabalho. Vou sentir falta do nosso convívio.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e do “corredor da Micro” por terem colaborado em diversas partes do meu trabalho; ao Prof. Marcelo Brígido, à Dra. Tainá Raiol e ao Waldeyr Mendes pelo apoio nas análises filogenéticas.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Prof. Marlene, pelo tempo concedido ao meu trabalho e pelos ensinamentos técnicos e de vida. Agradeço a paciência ao longo de quase 10 anos de orientação entre PIBIC, mestrado e doutorado.

Resumo

A endoesporulação constitui a estratégia de resistência mais eficiente para uma célula. Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) são isoladas dos mais diversos ambientes e acredita-se que tenham papel fundamental na ecologia destes sítios. As Bafes estão distribuídas em mais de 44 famílias e 420 gêneros dentro do filo *Firmicutes*, que abriga bactérias Gram positivas com baixo conteúdo G+C e parede celular muito rígida. Apesar da relevância na ecologia ambiental, da importância médica e do alto potencial tecnológico as Bafes são pouco caracterizadas. A maior parte dos estudos sobre esses microrganismos concentra-se nos modelos *Bacillus subtilis* e espécies do grupo do *B. cereus*. Esses resultados têm sido extrapolados para outras linhagens de Bafes, e nem sempre reflete a diversidade do grupo. As linhagens analisadas neste trabalho compõem a Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes) da Universidade de Brasília. Atualmente, a CBafes dispõe de um acervo de 312 linhagens selvagens designadas **SDF0001-SDF0312**, que estão estocadas à temperatura ambiente, em forma de esporos. Neste trabalho, foi analisada a filogenia de linhagens SDF com base na comparação de sequências consenso de rDNA 16S e genomas completos de linhagens selecionadas. A presença de uma assinatura para psicrotolerância e/ou termotolerância, dentro da sequência de rDNA 16S, foi verificada e os resultados obtidos foram relacionados com o crescimento em diferentes temperaturas. Foi realizado, ainda, um inventário do perfil plasmidial de linhagens selecionadas.

Abstract

Endospore formation is the most efficient resistance strategy for a bacterial cell. Aerobic endospore forming Bacteria (AEFB) are isolated from diverse environments and it is believed that they play a major role in the ecology. AEFB are distributed among more than 45 families and 420 genera in the *Firmicutes* phylum, which allocates Gram positive Bacteria with low G+C content and a very thick cell wall. Despite the relevance in environmental ecology, medical importance and technological potential, the AEFB are poorly characterized. Most studies about these microorganisms are based on model species such as *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. These results are extrapolated to other AEFB lineages, and not always reflect the diversity of the group. The strains analyzed in this work are deposited at the AEFB Collection (CBafes) from University of Brasilia. CBafes comprises 312 wild lineages assigned as **SDF0001-SDF0312**, maintained at room temperature as dry spores. In this work, 16S rDNA consensus sequences were used to establish SDF lineages phylogeny. A molecular signature in the 16S rDNA sequence for psychrotolerance and/or thermotolerance was assessed, and the results were correlated to those obtained from growing lineages in different temperatures. The plasmid profile of selected lineages was also assessed in this work.

Sumário

Sumário.....	6
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas.....	8
Lista de Siglas.....	9
I. Revisão bibliográfica.....	10
1. Filo <i>Firmicutes</i>	10
2. Bactérias aeróbias formadoras de endósporos.....	12
3. Taxonomia de Bafes.....	13
4. Endoesporulação.....	20
5. Plasmídeos de Bafes.....	26
6. Resposta a mudanças de temperatura.....	30
7. Filogenia molecular.....	33
8. Genes de rRNA 16S.....	40
9. Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos da Universidade de Brasília.	43
II. Justificativa.....	45
III. Objetivos.....	46
IV. Metodologia.....	47
V. Resultados e discussão.....	51
1. Germinação e crescimento de linhagens SDF em diferentes temperaturas.....	51
2. Busca por assinatura molecular associada a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas.....	56
3. Perfil plasmidial.....	62
4. Genes de rRNA 16S de linhagens SDF.....	68
5. Construção de árvores filogenéticas.....	74
Anexo – Artigo publicado.....	84
Referências Bibliográficas.....	94

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas de peptidoglicano	15
Figura 2. Representação dos estágios da esporulação	24
Figura 3. Ultraestrutura de esporos	25
Figura 4. Células de <i>B. subtilis</i> em esporulação	26
Figura 5. Distinção entre os alinhamentos global e local de duas sequências	35
Figura 6. Representação de uma árvore filogenética	38
Figura 7. Árvore filogenética universal	41
Figura 8. Avaliação de faixa de temperatura para crescimento de linhagens SDF	52
Figura 9. Crescimento de SDF0003 baixa temperatura.	54
Figura 10. Alinhamento de sequência assinatura de linhagens SDF mesófilas	57
Figura 11. Exemplos de perfil plasmidial de linhagens SDF soladas de solo do DF	66
Figura 12. Perfil plasmidial de linhagens SDF isoladas de solo do DF	68
Figura 13. Distribuição de linhagens SDF em nível de gênero	70
Figura 14. Espécies mais abundantes dentro do gênero <i>Bacillus</i>	71
Figura 15. Relação filogenética entre 192 linhagens	76
Figura 16. Relação filogenética entre as linhagens pertencentes a <i>B. pumilus</i> <i>sl</i> e <i>B. subtilis</i> <i>sl</i>	77
Figura 17. Relação filogenética entre as linhagens pertencentes a <i>B. cereus</i> <i>sl</i>	78
Figura 18. Linhagens SDF alocadas em gêneros da família <i>Bacillaceae</i>	80
Figura 19. Linhagens SDF alocadas na família <i>Paenibacillaceae</i>	82

Lista de Tabelas

Tabela I. Linhagens SDF com comportamennto não usual quando incubadas a 7 °C	55
Tabela II. Faixa de temperatura de crescimento e designação taxonômica de linhagens SDF 58	
Tabela III. Obtenção de protoplastos e plasmídeos (por lise alcalina) de linhagens selcionadas da Cbafes	63
Tabela IV. Distribuição de espécies de linhagens SDF	73
Tabela V. Linhagens SDF selecionadas para análise filogenética	75

Lista de Siglas

Bafes – Bactérias aeróbias formadoras de endósporos
C – carbono
CBafes – Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos
CSD – domínio de choque frio
DPA – ácido dipicolínico
EPS – substância exopolissacarídica
GFP – proteína fluorescente verde
HSP – proteínas de choque de calor
K – potássio
kb – quilobases
MALDI-ToF - *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization – Time of flight* (
MCF – microscopia de contraste de fase
MET – microscopia eletrônica de transmissão
ML – máxima verossimilhança
MP – máxima parcimônia
Na – sódio
NJ – distância entre vizinhos
Nt – nucleotídeo
OTU – unidade taxonômica operacional
pb – pares de bases
PC – parede celular
PG – peptideoglicana
SASP – pequenas proteínas ácido solúveis
sl – sensu lato
ss – sensu stricto
OTU – unidade taxonômica operacional
TGH – transferência gênica horizontal
TU – unidade taxonômica
UV - ultravioleta

I. Revisão bibliográfica

1. Filo *Firmicutes*

Em razão do avanço de técnicas moleculares, a taxonomia é uma área em constante adaptação. Dentro do filo *Firmicutes* as mudanças que ocorreram ao longo dos anos culminaram na classificação adotada atualmente pelo Manual de Bergey (de Vos *et al.*, 2009). A classificação anterior à última edição do Manual considerava que o filo era composto por três classes – *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes* (Garrity, 2005). Entretanto, a maioria dos membros alocados na classe *Mollicutes* tem baixa relação molecular com os representantes de outras classes, além de apresentar características fenotípicas únicas dentro do filo – como a ausência de parede celular (PC) rígida (de Vos *et al.*, 2009). Por essas razões, a classe foi removida do filo *Firmicutes*. A família *Erysipelotrichaceae*, inicialmente alocada na classe *Mollicutes*, originou uma nova classe do filo, denominada *Erysipelotrichia* (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009). Mais quatro linhagens de *Firmicutes* foram elevadas ao nível de classe: *Thermolithobacteria*, *Negativicutes*, *Limnochordia* e *Tissierellia* (Galperin, 2013; *List of prokaryotic names with standing in literature, LSPN*; www.bacterionet.com, 10/05/2018).

Atualmente, o filo *Firmicutes* consiste em sete classes – *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*, *Limnochordia*, *Tissierellia* e *Thermolithobacteria* – dentro das quais estão alocadas pelo menos 45 famílias e 420 gêneros (*List of approved bacterial names*; www.bacterionet.com, 10/05/2018). Uma característica marcante do filo é a presença de PC altamente rígida (Hutchison *et al.*, 2014; Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004). O filo também é fenotipicamente diverso, com células esféricas, retas, curvas, bastões, helicoidais ou sarcinas, podendo ou não apresentar flagelos. *Firmicutes* compreende espécies aeróbias, facultativas e anaeróbias. Embora a maioria das espécies seja mesófila, observa-se crescimento em ampla faixa de temperatura em alguns organismos, que podem ser classificados como psicrotolerantes e/ou termotolerantes. Poucas espécies são termófilas. Apesar de a maioria ser quimio-organotrófica, alguns membros são

fotoheterotróficos anoxigênicos. O crescimento ótimo *in vitro* da maior parte das espécies se dá em pH neutro, mas podem ser encontradas espécies acidófilas ou alcalífilas. Em geral, os genomas apresentam conteúdo de G+C <50%.

A formação de endósporos (deste ponto designados esporos) é uma característica exclusiva de membros de *Firmicutes* e é observada na maioria das linhagens do filo, tanto aeróbias quanto anaeróbias, (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Garrity, 2005; Fritze, 2004). Entretanto, a endoesporulação não constitui uma característica universal. Todas as linhagens alocadas na classe *Thermolithobacteria* são asporogênicas. Nas demais classes, espécies formadoras de endósporos coexistem com não formadoras, sendo que um mesmo gênero pode incluir espécies esporulantes e asporogênicas. Contudo, os membros capazes de formar endósporos compartilham um conjunto mínimo de genes homólogos envolvidos na esporulação (Galperin, 2013; Fritze, 2004). Mutações nesses genes, podem interromper o processo em diversas etapas, diminuir a fração de células que podem esporular ou resultar em mutantes asporogênicos. É importante ressaltar que não existe um gene específico presente no genoma de todas as espécies esporulantes e ausente nas asporogênicas que possa ser utilizado como marcador universal da esporulação. Aparentemente, a habilidade de formar esporos foi perdida por algumas linhagens ao longo da evolução, sugerindo que a sobrevivência ambiental baseada na produção de um esporo viável tenha um custo elevado.

Ferdinand Cohn foi o primeiro a descrever o processo de esporulação e iniciou a mudança da nomenclatura de algumas espécies, como é o caso do *Vibrio subtilis*, que foi renomeado *Bacillus subtilis*, em 1872 (*apud* Verbaendert e de Vos, 2011), e se tornou, desde então, o paradigma da endoesporulação. 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 em bastão, naquele momento a única forma bacteriana conhecida

(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, estabelecer uma hierarquia taxonômica mais apropriada (Fritze, 2004). Atualmente, as espécies de bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) estão distribuídas em mais de 40 famílias e 400 gêneros dentro do filo *Firmicutes* (www.bacterionet.com, 10/05/2018).

2. Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

A diversidade genética e fisiológica das Bafes se reflete na variedade de *habitats* colonizados por esses organismos. As Bafes são ubíquas e representam a maior parte da microbiota em muitos ambientes naturais (Galperin, 2013; Hong *et al.*, 2009; Reva *et al.*, 2001). Acredita-se que o solo seja o principal reservatório desses organismos (Logan e de Vos, 2011; Gardener, 2004), onde são considerados de extrema importância, pois o hábito saprófita da maioria das linhagens sugere um papel na ciclagem de carbono e nitrogênio (Mandic-Mulec e Prosser, 2011). A capacidade em crescer em uma ampla faixa de temperatura e a presença de espécies alcalífilas, neutrófilas e acidófilas contribuem para a ubiquidade desses microrganismos (de Vos *et al.*, 2009). Outro fator importante que permite algumas espécies de Bafes colonizar uma grande diversidade de ambientes é a secreção de proteases e outras hidrolases, característica que tem sido largamente explorada para fins biotecnológicos (de Vos *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009). Além da diversidade metabólica, a alta resistência dos esporos é de extrema relevância para a ubiquidade das Bafes (Galperin, 2013).

Apesar de serem descritas outras técnicas seletivas empregando agentes químicos e meios de cultura específicos, o método mais utilizado 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; Mandic-Mulec e Prosser, 2011). Em condições físico-

químicas apropriadas, os esporos viáveis germinam e a célula resultante se divide por fissão binária.

As aplicações das Bafes são muito diversas, porém, a despeito dos benefícios, algumas espécies podem representar um problema para a saúde e indústria. Por exemplo, o *B. cereus* é um agente causador de intoxicação alimentar, constantemente associado a produtos alimentícios industrializados ou *in natura* (Van der Auwera, *et. al*, 2007). Outra espécie considerada um problema para a saúde e biodefesa é o *B. anthracis*, agente causador do antraz e utilizado como arma biológica (Jensen, *et. al*, 2003).

Apesar das características notáveis das Bafes, o conhecimento sobre a Biologia destes microrganismos é extrapolado a partir do conhecimento de poucas espécies, notadamente, o *B. subtilis* e alguns membros do grupo do *B. cereus* (Hutchison *et al.*, 2014; Galperin, 2013; Logan e de Vos, 2011; Van der Auwera *et al.*, 2007; Fritze, 2004).

3. Taxonomia de Bafes

Dentro do filo *Firmicutes*, as Bafes estão alocadas na classe *Bacilli*, onde 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 descritas, as principais características das famílias *Bacillaceae* e *Paenibacillaceae*, serão detalhadas a seguir, com ênfase nos gêneros com maior número de espécies conhecidas.

3.1 Família Bacillaceae

A família *Bacillaceae* abriga gêneros compostos por espécies aeróbias ou facultativas, quimiorganotróficas, com PC Gram positiva típica e, em maioria, formadoras de esporos (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; de Vos *et al.*, 2009).

Até os anos 1990, os membros da família eram todos acomodados, erroneamente, no gênero *Bacillus* (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; Verbaendert e de Vos, 2011). A partir deste período, ocorreram diversas mudanças taxonômicas decorrentes de análises baseadas em sequências de genes de rRNA 16S, e diversos novos gêneros foram propostos para realocar estas espécies de maneira apropriada (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009). Novos gêneros são continuamente descritos como resultado de uma enorme variedade de isolados provenientes dos mais diversos ambientes. Alguns desses novos gêneros são propostos com base na descrição de apenas uma espécie e a partir de um único isolado (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; www.bacterionet.com, 10/05/2018).

3.1.1. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi criado por Ferdinand Cohn em 1872 que classificou a espécie tipo, o *B. subtilis*, como um bacilo quimioheterotrófico, aeróbio e formador de esporo (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; Verbaendert e de Vos, 2011).

Dentro da família *Bacillaceae*, o gênero *Bacillus* acomoda, pelo menos, 370 espécies, o que representa o maior número de espécies de Bafes conhecidas e melhor estudadas (www.bacterionet.com, 10/05/2018). Segundo o Manual de Bergey Firmicutes (de Vos *et al.*, 2009), a grande maioria das espécies é aeróbia ou facultativa. A morfologia e o tamanho das colônias variam entre as espécies e as células se apresentam em forma de bastão reto ou curvado, que podem estar isoladas, ou associadas em pares ou cadeias (estreptobacilos), de tamanhos variados. A ligação cruzada mais comumente encontrada entre as diversas camadas de peptidoglicana (PG) envolve resíduos de ácido meso-diaminopimélico (*meso*-DAP) na terceira posição (Figura 1). Esses organismos podem apresentar motilidade por flagelos peritríquios, ou ser imóveis. São isolados principalmente do solo e em geral crescem em meios de cultura complexos utilizados rotineiramente. Os esporos altamente resistentes a

diversos agentes físicos e químicos fazem dos organismos pertencentes a esse gênero possíveis contaminantes, principalmente, na indústria alimentícia. A maioria das espécies não apresenta potencial patogênico.

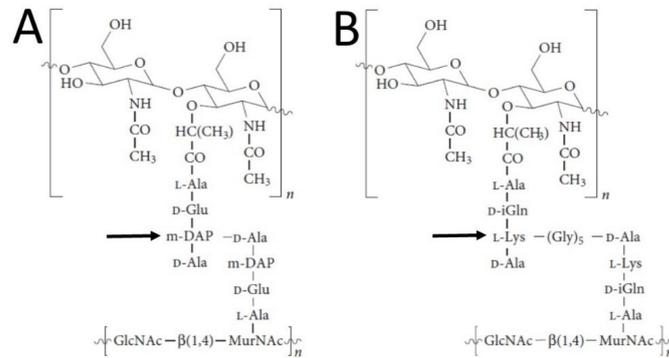


Figura 1. Estruturas de peptidoglicano. O peptidoglicano é um polímero de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) unidos por ligações β -1,4 e com cadeia lateral tetrapeptídica ligada aos resíduos de MurNAc. As cadeias peptídicas adjacentes são unidas por uma ligação cruzada direta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

3.1.1.1. Grupo do *B. cereus*

O grupo do *B. cereus* ou *B. cereus sensu lato (sl)* é um *cluster* homogêneo, ou seja, formado 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 (ss)*, *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 sétima e oitava espécies do grupo, respectivamente. Curiosamente, o *B. toyonensis* foi descrito primariamente como uma subespécie do *B. cereus ss* 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 ss é associado à intoxicação alimentar que pode se manifestar de duas formas distintas: diarreia e dor abdominal ou náusea e vômito (Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003). Essa espécie está presente em muitos produtos alimentícios e, por esta razão, é ingerida em pequenas quantidades contribuindo para a microbiota intestinal transitória (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; Ehling-Schulz *et al.*, 2005).

O *B. anthracis* é o agente causador do antraz e a virulência está associada à presença de dois megaplasmídeos – pXO1 e pXO2 – que codificam os fatores tóxicos (toxina tripartida) e a pouco usual cápsula formada por um polímero de ácido D-glutâmico, respectivamente (Kølsto *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2003). Por isso, não é surpreendente que a perda de pXO2 resulte em um mutante incapaz de estabelecer infecção.

O *B. thuringiensis*, produz cristais parasporais constituídos de proteínas Cry e/ou Cyt, utilizadas por mais de 70 anos como controle de insetos de diversas ordens e outros invertebrados (Sansinenea e Ortiz, 2011; Joung e Côté, 2001; Schnepf, 1998). Uma família de proteínas Cry, denominadas parasporinas, possui toxicidade específica para células cancerígenas de diversas origens, incluindo humanas (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 apresentam atividade contra espécies fúngicas ou inibição do crescimento de patógenos de animais, incluindo humanos, por exemplo *Listeria monocytogenes* (Tourasse *et al.*, 2006).

Apesar de ser um grupo de bactérias mesófilas, o *B. cereus* sl ainda inclui o *B. weihenstephanensis*, um membro psicrotolerante (Guinebretière *et al.*, 2008; 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 dos membros de *B. cereus* *sl* 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 genéticos móveis (transposons, sequências de inserção e fagos), em sinergia com diversos mecanismos de transferência gênica horizontal (TGH).

3.1.1.2. Grupo do *B. subtilis*

O *B. subtilis* *sl* compreende as espécies: *B. subtilis* *ss*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* e *B. sonorensis* (Wang *et al.*, 2007). Assim como o *B. cereus* *sl*, as espécies desse grupo são estreitamente relacionadas, não sendo possível fazer a distinção entre as diferentes 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 celulases, dentre outras hidrolases), antibióticos, fermentação de alimentos, vitaminas etc (Jeyaram *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007). Além da importância relacionada a produção de hidrolases e outros metabólitos, o *B. subtilis* *ss* participa da formação de biofilmes que previnem infecções causadas por patógenos de plantas (Park *et al.*, 2009) e, também é explorado como fator de crescimento vegetal (Lugtenberg e Kamilova, 2009; Kloepper *et al.*, 2004).

3.1.2. Gênero *Lysinibacillus*

Até 2007, as espécies do gênero *Lysinibacillus* eram alocadas no gênero *Bacillus*, quando Ahmed e cols. propuseram a criação de um novo gênero para o qual foram transferidas. A principal característica que distingue *Lysinibacillus spp.* de outras Bafes é a presença de L-lisina, como terceiro resíduo de aminoácido na PG da PC, conforme ilustrado na figura 1 (Nam *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2007). Comumente, o aminoácido de terceira posição da PC de *Bacillus spp.* é o meso-DAP, como já mencionado (Figura 1, pág. 9).

No artigo de proposição do gênero *Lysinibacillus* (Ahmed *et al.*, 2007), os autores descrevem a morfologia da célula vegetativa em forma de bastão e os endósporos, com morfologia esférica ou elíptica localizados em posição terminal de um esporângio deformado. Podem apresentar motilidade. A espécie tipo do gênero é *L. boronitolerans*. Algumas linhagens de *L. sphaericus* produzem um cristal parasporal, depositado no inter espaço — espaço entre o exospório e a capa externa do esporo (ver Figura 3, pág. 19) — e é utilizado em controle biológico de insetos da ordem *Diptera* (Lacey *et al.*, 2015; Berry, 2002).

3.1.3. Gênero *Geobacillus*

A maioria dos termófilos alocados no gênero *Bacillus* foi transferida para um novo gênero designado *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 ou vitaminas e utiliza n-alcenos como fonte de C e energia.

3.2. Família *Paenibacillaceae*

Na família *Paenibacillaceae*, o gênero *Paenibacillus*, com mais de 230 espécies descritas, é o segundo gênero em número de espécies conhecidas de Bafes (www.bacterionet.com.br; 10/05/2018). As espécies podem ser aeróbias, microaerófilas, facultativas ou anaeróbicas. As células vegetativas podem responder à coloração de Gram de forma positiva, negativa ou variável. A motilidade por flagelos peritríquios é comum, embora algumas espécies sejam atríquias. Uma das principais características fenotípicas dos organismos descritos nesta família é o endósporo oval, ou elipsoidal com esporângio deformado (de Vos *et al.*, 2009).

3.2.1. Gênero *Paenibacillus*

No Manual de Bergey *Firmicutes* (de Vos *et al.*, 2009), as espécies alocadas no gênero *Paenibacillus* são descritas como organismos em forma de bastão com PC apresentando estrutura típica de Gram positivos, mas que quase sempre respondem como Gram negativos sendo, portanto, Gram variáveis. Quando há motilidade, esta é mediada 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, baixa concentração de nutrientes ou concentrações sub-tóxicas 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.

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 encontradas é o solo, principalmente aqueles ricos em húmus e material vegetal hidrolisáveis por exoenzimas que processam carboidratos. A espécie tipo é *P. polymyxa*.

4. Endoesporulação

A diferenciação celular é um processo biológico que envolve a coordenação e o estabelecimento de programas distintos de expressão gênica, que resultam em mudanças morfológicas e fisiológicas nos diferentes tipos celulares envolvidos (Hilbert e Piggot, 2004; Driks, 1999).

A endoesporulação (deste ponto designada esporulação), ou formação de esporos, em *B. subtilis* ss é um sistema primitivo de diferenciação celular, que tornou-se o paradigma para o estudo deste processo (Hutchison *et al.*, 2014; Hilbert e Piggot, 2004). Apesar da compreensão sobre a esporulação em *B. subtilis* ser extrapolado para outras espécies, não se conhece alguns aspectos fundamentais do processo para outras linhagens. Mais frequentemente, a esporulação é observada em bactérias em forma de bastão, mas o evento também pode ocorrer em células helicoidais e sarcina (Hutchison *et al.*, 2014).

A genômica comparada tem revelado um conjunto de genes e alguns aspectos estruturais do programa que parecem ser universalmente conservados entre as linhagens formadoras de endósporos de *Firmicutes* (Hutchison *et al.*, 2014; Galperin, 2013; Hilbert e Piggot, 2004). Isto sugere que um programa de diferenciação celular robusto e sofisticado estava presente no último ancestral comum de todos os membros de *Firmicutes*, que produzem descendentes ou esporos no interior do esporângio.

O modelo da esporulação representado pela espécie *B. subtilis*, tem como principal função garantir a sobrevivência em condições inadequadas para a viabilidade de células vegetativas já que o esporo é uma forma celular altamente resistente (Hutchison *et al.*, 2014; Moeller *et al.*, 2014;

Setlow, 2007; Hilbert e Piggot, 2004; La Duc *et al.*, 2004; Vreeland *et al.*, 2000; Cano e Borucki, 1995). Em adição, sabe-se que, em algumas espécies, as vias metabólicas de esporulação evoluíram para novos sistemas reprodutivos, porém os detalhes ainda permanecem pouco conhecidos (Hutchison *et al.*, 2014). Assim, algumas espécies são capazes de formar células descendentes, que permanecem no interior do citoplasma em diversas linhagens de *Firmicutes*, como *Epulopiscium spp.* e de gêneros correlatos.

Mesmo na presença de umidade, os esporos 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 aqueles que empregam calor seco e úmido, radiações γ e ultravioleta (UV), dessecação ou compostos químicos altamente tóxicos, como o peróxido de hidrogênio. A partir deste ponto, as etapas e demais características do processo de esporulação descritas são baseadas na espécie modelo *B. subtilis*.

A metamorfose de células vegetativas em células dormentes ocorre dentro do esporângio que é composto por dois compartimentos e está resumida na figura 2 (Driks, 1999; Cutting *et al.*, 1990). O compartimento maior é denominado célula mãe e o menor pré-esporo (Piggot e Hilbert, 2004; Phillips e Strauch, 2002; Driks, 1999).

A formação de um esporo ocorre durante a fase estacionária e 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 do evento estão resumidos a seguir e na figura 2:

- **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 PG modificada, ligadas frouxamente, no espaço entre as membranas que envolvem o cerne do, então, pré-esporo;
- **Estágio V** — Formação da capa;
- **Estágio VI** — Maturação do esporo;
- **Estágio VII** — Lise do esporângio e liberação do esporo maduro para o meio externo.

O esporo maduro resultante do processo de diferenciação é composto por um conjunto de estruturas de proteção arranjadas em camadas concêntricas (Piggot e Hilbert, 2004; Phillips e Strauch, 2002; Driks, 1999). Em conjunto com os componentes do citoplasma, ou cerne do esporo, cada uma dessas estruturas contribui para a resistência da célula, 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 de uma espécie extinta de abelha, preservados em âmbar (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 *Virgibacillus spp.* de amostras de cristais de cloreto de sódio do período Permiano, datadas com mais de 250 milhões de anos. Essas descobertas corroboram a extrema resistência desses esporos.

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 a espécie anaeróbia *Clostridioides difficile*, anteriormente classificada como *Clostridium difficile* (Lawson *et al.* 2016; Hilbert e Piggot, 2004). As conclusões obtidas a partir de estudos fundamentados em *B. subtilis* são geralmente válidas para os membros da família *Bacillaceae*, além de outras, e representam as características gerais deste processo de diferenciação celular.

A decisão de uma população em esporular é tomada em resposta ao *quorum sensing* (Hilbert e Piggot, 2004; Driks, 2003). Em conjunto a alta densidade celular, moléculas sinalizadoras e outros sinais ambientais, principalmente baixas concentrações de carbono e nitrogênio ou, em algumas circunstâncias, fósforo, disparam a esporulação (Setlow, 2007; Baràk *et al.*, 2005; Hilbert e Piggot, 2004; Grossman e Losick, 1988). Portanto, as bactérias capazes de esporular possuem vias complexas de transdução de sinal que monitoram e respondem rapidamente aos diversos sinais ambientais (Baràk *et al.*, 2005; Haldenwang, 1995).

Antes do evento de diferenciação ser disparado, o genoma da célula em final de fase logarítmica é duplicado (Hilbert e Piggot, 2004; Fujita e Losick, 2003; Driks, 1999. Figura 2). Em seguida, um mecanismo particular de segregação cromossomal garante que as regiões onde estão localizadas cada uma das duas origens de replicação (*oriC*) sejam arrastados para os polos opostos da célula produzindo uma estrutura alongada denominada filamento axial, que estende-se ao longo do citoplasma do esporângio, tornando a célula em diferenciação maior que a célula vegetativa (Ramamurthi e Losick, 2008; Baràk *et al.*, 2005. Figura 2).

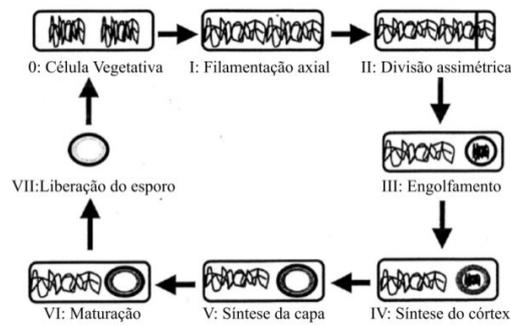


Figura 2. Representação dos estágios da esporulação. As principais características morfológicas e bioquímicas em cada estágio estão indicadas abaixo da representação gráfica da evolução do processo. Fonte: adaptado de Hilbert e Piggot, 2004.

Uma vez formado o filamento axial, o próximo passo da esporulação é a formação do septo assimétrico (Hilbert e Piggot, 2004; Driks, 1999. Figura 2). A septação torna o processo de esporulação irreversível. Logo após a formação do septo, dois programas de expressão gênica diferentes, mas interdependentes, são iniciados primeiramente no compartimento do pré-esporo e em seguida no da célula mãe (Figura 3), dirigidos por dois fatores σ distintos, e específicos da esporulação, localizados em ambos os compartimentos (Bàrak *et al.*, 2005). Sendo assim, durante esporulação a expressão gênica é regulada espacial e temporalmente (Hilbert e Piggot, 2004, Driks, 1999). Os dois compartimentos do esporângio se comunicam durante o processo, principalmente durante os pontos de inspeção (*checkpoints*), garantindo que a expressão gênica em ambos compartimentos permaneça coordenada (Setlow, 2007).

Após o engolfamento (estágio III) do pré-esporo pelo envelope celular do esporângio (Figura 2), ocorre a síntese de uma espessa camada de PG com ligações cruzadas frouxas, depositada entre as membranas interna e externa do pré-esporo (Setlow, 2007, Driks, 1999. Estágio IV – Figura 2). Essa camada de PG atípica que circunda o cerne do esporo recebe o nome de córtex (Driks, 2003) e regula a capacidade de contração e distensão do esporo em resposta a umidade relativa do ambiente, sem romper com a estrutura funcional da célula. Entre os estágios IV e V, o pré-esporo absorve grandes quantidades de ácido dipicolínico (DPA) produzido pela célula mãe. O DPA é quelado por

íons de cálcio formando o polímero dipicolinato de cálcio (Ca-DPA), que contribui para a resistência do esporo ao calor seco e úmido e peróxido de hidrogênio, correspondendo a cerca de 20% do peso seco do núcleo. A presença de Ca-DPA causa a diminuição da quantidade de água no interior do pré-esporo, resultando em 20% a 30% do volume original (Setlow, 2007). As pequenas proteínas ácido-solúveis (do inglês, SASP) estão presentes em altos níveis (5-10% de proteínas totais) e acidificam o cerne (pH 5,0-6,0). Em conjunto com a baixa quantidade de água, o pH ácido contribui para baixar a taxa metabólica do esporo a níveis não detectáveis. As SASP estão envolvidas na proteção do DNA, principalmente contra os efeitos da radiação UV (Setlow, 2007).

Nos estágios finais da esporulação camadas proteicas complexas, denominadas capas interna e externa do esporo (Figura 3), são depositadas sobre o córtex (Setlow, 2007). Uma camada mais externa da capa do esporo, a crosta, foi descrita em *B. subtilis* por McKenney e cols (2010). Embora ausente em *B. subtilis*, algumas espécies podem apresentar uma camada adicional denominada exospório (Figura 3B), cuja função ainda não foi completamente caracterizada, podendo, entre outras indicações, estar envolvida em adesão a superfícies (Driks, 2003). A ultraestrutura de esporos maduros, obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET), está ilustrada na figura 3.

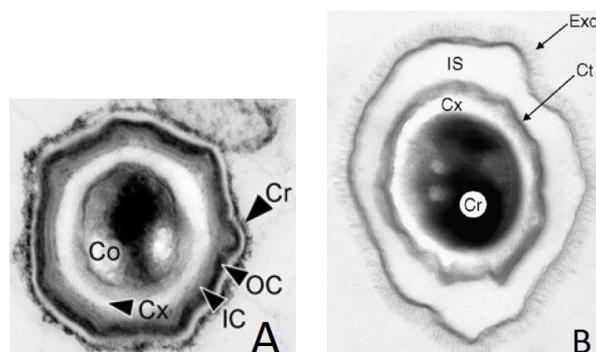


Figura 3. Ultraestrutura de esporos. Micrografia de esporos observado por MET. (A) *B. subtilis*: cerne (Co); córtex (Cx); capa interna (IC); capa externa (OC); crosta (Cr). Fonte: adaptado de McKenney et al., 2010. (B) *B. anthracis*: (Cr), núcleo; (Cx), córtex; (Ct), capa; (IS), espaço entre a capa e o exospório; (Exo), exospório. Fonte: adaptado de Driks, 2009.

O esporo maduro ou livre resultante desse processo, bem como o esporo em formação (endósporo) são estruturas altamente refratáveis e vistas com um brilho típico sob microscopia de contraste de fase (MCF), como pode ser observado na figura 4 (de Vos *et al.*, 2009; Hilbert e Piggot, 2004). Os tipos morfológicos – esféricos, ovalados ou fusiformes – bem como a localização – central, subterminal, terminal ou lateral – e a observação da capacidade de deformar ou não o esporângio durante a formação, são utilizados como parâmetros de classificação de espécies formadoras de endósporos.

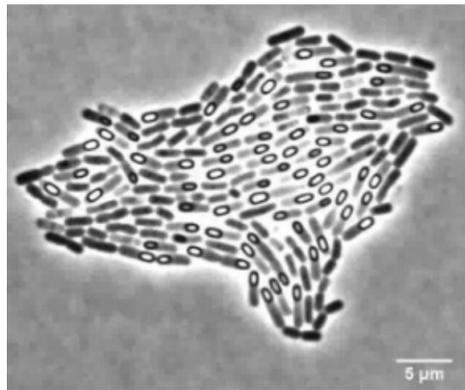


Figura 4. Células de *B. subtilis* em esporulação. Células em estágios avançados da esporulação observadas por MCF, onde é possível visualizar os esporos ovalados em formação com o brilho característico na porção terminal dos esporângios. Fonte: adaptado de Eijlander *et al.*, 2014.

5. Plasmídeos de Bafes

A TGH é a forma mais simples de propagar um grande 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,

incluindo aqueles com produtos envolvidos em resistência a antimicrobianos.

A conjugação é um processo biológico altamente específico e requer a fusão de envelopes das células envolvidas (Wegrzyn, 2005; Llosa e de La Cruz, 2005; Grohmann, 2003). Durante a ocorrência deste 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 parte da informação cromossomal e co-transferência 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; Lederberg, 1997). Outra característica relevante destes elementos refere-se ao conteúdo de informações relacionadas à virulência, incluindo resistência a antimicrobianos, degradação de compostos tóxicos e resistência a 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).

Ao longo do ciclo celular, os plasmídeos bacterianos regulam a 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 por cromossomo, 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).

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

O DNA plasmidial pode constituir quantidade substancial do genoma bacteriano, no caso do *B. thuringiensis*, pode 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 a aptidão ou o valor adaptativo (*fitness*) das espécies em uma grande variedade de nichos (Papazizi *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 (Kølsto *et al.*, 2009; Fritze, 2004). 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 elementos são conjugativos e apresentam capacidade de

mobilização de outros plasmídeos não 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* ss — 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). Como citado anteriormente, 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* e *cyt*, codificadores das toxinas Cry e Cyt, respectivamente, 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 via de produção de cereulídeo — que causa a síndrome emética — é codificada por um grande plasmídeo (208 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 do grupo do *B. cereus* (Maughan e Van der Auwera, 2011; Van der Auwera *et al.*, 2007). Por exemplo, alguns casos graves de infecção pulmonar, semelhantes a infecções atribuídas ao *B. anthracis*, na realidade foram causados por *B. cereus*. As linhagens de *B. cereus* responsáveis por essas infecções portam um plasmídeo contendo 99,6% de identidade com o plasmídeo pXO1 de *B. anthracis* (Hoffmaster *et al.*, 2004). Essas linhagens também apresentam um outro plasmídeo que codifica atividades envolvidas na via de produção de cápsula polissacarídica, ao contrário da cápsula típica de *B. anthracis*, composta por homopolímero de ácido D-glutâmico.

A espécie *B. thuringiensis*, amplamente utilizada em controle biológico de insetos, é

categorizada como classe de risco biológico I. 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*, bastante estudado em razão das propriedades conjugativas (Van der Auwera e Mahillon, 2008; Van der Auwera *et al.*, 2007).

Em adição, 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* (Van der Auwera *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 delineado pelas limitações das classificações tradicionais de espécies.

6. Resposta a mudanças de temperatura

As bactérias são notórias por habitarem diferentes tipos de ambiente, onde estão sujeitas a variações regulares e repentinas da temperatura (Eriksson *et al.* 2002; Grauman *et al.*, 1996). As temperaturas nos nichos ocupados por microrganismos podem variar consideravelmente, tanto ao longo de um dia, quanto ao longo das estações (Eriksson *et al.* 2002). Sendo assim, os processos biológicos sofrem alterações para que a célula possa se adaptar às frequentes variações de temperatura (Eriksson *et al.* 2002; Prüss *et al.*, 1999; Jones e Inouye, 1994).

É importante notar que as temperaturas cardinais – temperaturas mínima, máxima e ótima de crescimento – variam entre as espécies e que os organismos podem ser classificados de acordo com a habilidade em crescer em diferentes faixas de temperatura (Madigan *et al.*, 2016):

- i) Psicrófilo: é um organismo com temperatura ótima de crescimento de 15 °C ou inferior e temperatura máxima abaixo de 20 °C.
- ii) Psicrotolerante: capaz de crescer a temperaturas baixas, mas tendo temperatura ótima acima de 20 °C.
- iii) Mesófilo: um organismo que cresce melhor a temperaturas entre 20 e 40 °C
- iv) Termotolerante: capaz de crescer a temperaturas altas, mas tendo temperatura ótima entre 20 °C e 45 °C.
- v) Termófilo: um organismo cuja temperatura ótima de crescimento reside entre 45 e 80 °C.
- vi) Hipertermófilo: um procarioto que apresenta temperatura ótima de crescimento de 80 °C ou superior.

As principais respostas celulares às variações de temperatura são as mudanças na fluidez da membrana plasmática e alterações de conformação da estrutura funcional de ácidos nucleicos e proteínas (Brillard *et al.*, 2010; Eriksson *et al.* 2002). Para que estas adaptações aconteçam, é necessário que ocorram mudanças no padrão da expressão gênica, que responde às diferentes faixas de temperatura. Tais mudanças requerem a ativação de sensores celulares, que monitoram o ambiente e induzem a resposta (Mazzon *et al.*, 2012; Eriksson *et al.* 2002).

van Bogelen e Neidhart (1990) propuseram que os ribossomos podem funcionar como sensores primários de mudanças de temperatura e que a atuação dessas estruturas celulares envolve: (i) o estado físico da partícula, ou a natureza de algum produto da tradução que sinaliza a mudança de

temperatura e ativação da expressão de genes de resposta à esse estímulo ambiental e (ii) o direcionamento das alterações na tradução em resposta a mudança de temperatura.

Considerando o papel dos ribossomos na resposta às variações de temperatura, Prüss e cols. (1999) correlacionaram a presença de sequências assinaturas em genes de rRNA 16S em linhagens mesófilas e psicrotolerantes do grupo do *B. cereus* com a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas e observaram divergências nas sequências desses ortólogos.

Além da sugestão do papel do ribossomo na regulação da resposta às mudanças de temperatura, também existem diversas proteínas com funções adaptativas para a variação de temperatura (Mazzon *et al.*, 2012; Eriksson *et al.* 2002). A expressão de proteínas contendo domínio choque frio (designadas CSD, do inglês *cold shock domain*) é induzida em baixas temperaturas e/ou em fase estacionária. Em tais condições, as proteínas CSD auxiliam na tradução atuando como chaperonas de RNA mensageiro (mRNA), e, também, como reguladoras da expressão de diversos genes.

A principal proteína de resposta ao choque frio, CspA, foi primeiramente identificada em *Escherichia coli* (Eriksson *et al.* 2002; Stanfors e Granum, 2001). A CspA aumenta a transcrição de outros genes expressos em resposta a baixas temperaturas, sugerindo que esta proteína possa agir como um ativador geral da transcrição do regulón de resposta ao choque frio. Estruturas homólogas também foram observadas em diversas linhagens de bactérias, como a CspB de *B. subtilis* (Grauman *et al.* 1996).

A resposta de choque de calor foi descrita primeiramente em *Drosophila* e, atualmente, é considerada uma resposta celular universal à elevação de temperatura do ambiente (van Bogelen e Neidhart, 1990). A resposta envolve atividades de proteínas denominadas HSP, do inglês *heat shock proteins*. A expressão das HSP pode ser reprimida quando há uma diminuição na temperatura. Além da temperatura, um subconjunto dessas proteínas pode ser ativado sob outras condições de estresse.

7. Filogenia molecular

Filogenia molecular é o estudo das relações evolutivas entre organismos, genes ou proteínas combinando o conhecimento em 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 essas sequências podem ter derivado durante a evolução (Mount, 2004). Os dados que descrevem as relações evolutivas são utilizados para construir um gráfico bidimensional denominado árvore evolutiva (Dagan, 2011; Polanski e Kimmel, 2007; Mount, 2004).

Para usar os dados moleculares na reconstrução da história evolutiva são necessárias algumas suposições (Xiong, 2006). A primeira é que as sequências moleculares usadas nas análises são homólogas, ou seja, que descendem de um ancestral comum. Assume-se ainda que a divergência filogenética é uma bifurcação onde um galho parental se divide em dois galhos filhos em um dado momento. Outra suposição é que cada posição em uma sequência evolui independentemente e que a variabilidade entre as sequências é suficientemente informativa para a construção de árvores filogenéticas sem ambiguidade.

7.1. Base evolutiva

A evolução pode ser definida como o desenvolvimento de uma forma biológica a partir de outra preexistente (Portin, 2015; Xiong *et al.*, 2006). A força motriz da evolução é a seleção natural, onde formas não adaptadas tendem a ser eliminadas pelas condições ambientais ou seleção sexual (Portin, 2015; Xiong, 2006). O mecanismo por trás da evolução são mutações genéticas que ocorrem ao acaso e fornecem diversidade biológica a uma

população, ou seja, a variabilidade que contribui para o sucesso na sobrevivência de uma população (Skinner, 2015).

O DNA e as proteínas são produtos da evolução. Os nucleotídeos e aminoácidos podem ser considerados fósseis moleculares já que codificam a história de milhões de anos de evolução (Xiong, 2006). Ao longo dos anos as sequências sofreram mutações randômicas e algumas dessas foram selecionadas pelo processo de evolução. Tais sequências acumulam gradualmente as mutações e divergem com o passar do tempo, porém, traços da evolução podem permanecer em certas porções, o que permite a identificação de um ancestral comum (Skinner, 2015; Xiong, 2006). A manutenção dessas porções se deve ao fato de que alguns resíduos têm papel crucial para a estrutura ou função e, por isso, são perpetuados ao longo das gerações. Outras regiões com papéis menos cruciais podem sofrer mutações com maior frequência. Assim, comparando sequências de DNA ou proteínas é possível identificar padrões de conservação e variação.

7.2. Alinhamento de sequências

O alinhamento de sequências é o processo de comparação de duas (alinhamento de pares) ou mais (alinhamento múltiplo) sequências onde se busca uma série de caracteres individuais ou padrões de caracteres comuns para que se estabeleça uma correspondência entre os resíduos das sequências relacionadas (Xiong, 2006; Mount, 2004). Além da busca por padrões, é necessário que sejam inseridos espaços ou lacunas (*gaps*) nas sequências para tornar o tamanho equivalente (Souza, 2010). Assim é possível sobrepor o conjunto analisado e comparar as bases.

Existem dois tipos de alinhamento, o global e o local (Figura 5). No alinhamento global assume-se que duas sequências são similares ao longo de todo o comprimento (Xiong, 2006; Mount, 2004). O alinhamento é feito do início ao fim das sequências para encontrar o melhor

alinhamento possível. Este método é o mais adequado para sequências relacionadas e com tamanhos semelhantes. Já o alinhamento local busca regiões com altos níveis de similaridade e prioriza esses locais sobre o restante da sequência (Xiong, 2006; Mount, 2004). Esse método pode ser usado em sequências com maior grau de divergência para encontrar padrões conservados entre essas.

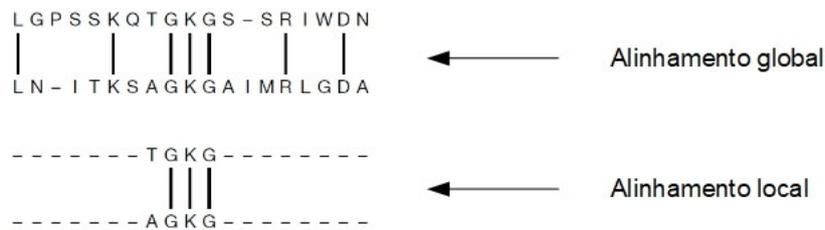


Figura 5. Distinção entre os alinhamentos global e local de duas sequências.
 Fonte: adaptado de Mount, 2004.

O alinhamento global ótimo de duas sequências foi realizado primeiramente utilizando o algoritmo Needleman-Wunsch (Needlemand e Wunsch, 1970). A noção de alinhamento local ótimo entre duas sequências foi introduzida em 1981 pelo algoritmo de Smith e Waterman. Ambos algoritmos se baseiam no método de programação dinâmica, onde o alinhamento ótimo é obtido pela combinação de todos os pares de caracteres possíveis entre as sequências analisadas (Xiong, 2006; Koonin e Galperin, 2003). Esse método cria uma matriz bidimensional, cujos eixos são as sequências, e atribui valores coincidentes (*matches*) e não coincidentes (*mismatches*). A maior pontuação nessa matriz indica o melhor alinhamento possível. Os dois algoritmos citados são $O(n^2)$, ou seja, o tempo e a memória requeridos para gerar o alinhamento ótimo são proporcionais ao produto do comprimento das sequências comparadas (como conveniência, assume-se nesta notação que as sequências têm igual tamanho n). Algoritmos ótimos para múltiplas sequências tem complexidade $O(n^k)$, onde k é o número de sequências comparadas. Tais algoritmos podem não ser computacionalmente

viáveis dependendo do valor de n e/ou k . Portanto os métodos para alinhamentos múltiplos de sequências fornecem apenas uma aproximação e não garantem o alinhamento ótimo (Koonin e Galperin, 2003).

Para que o melhor alinhamento seja obtido é necessária a adição de *gaps* que correspondem às inserções ou deleções (*indels*) que ocorrem ao longo do processo evolutivo (Souza, 2010; Mount, 2004). Naturalmente, a ocorrência de *indels* é mais rara que as substituições, por isso a adição de *gaps* deve ser computacionalmente limitada (Xiong, 2006). A determinação de penalidade para *gaps* pode ser arbitrária, já que não existe uma teoria evolutiva que estabeleça o custo específico da existência de *indels* (Koonin e Galperin, 2003). Para evitar alinhamentos que não refletem a realidade, os programas utilizados para este fim apresentam valores padrões obtidos a partir de estudos com proteínas globulares (Xiong, 2006). Outro fator a ser considerado é a diferença no custo para a abertura e para a extensão de um *gap*. Caso ocorram *indels*, é provável que outros resíduos sejam inseridos ou deletados em conjunto. Desta forma, o custo de abertura de um novo *gap* deve ser maior que o custo de extensão de um *gap* já existente.

O alinhamento é o passo crucial para a construção de uma árvore filogenética, pois estabelece as divergências que podem ter surgido ao longo da evolução (Mount, 2004). Assim, apenas o alinhamento correto produz a filogenia correta porque assume-se que as posições alinhadas têm relação evolutiva (Xiong, 2006).

7.4. Árvores filogenéticas

Uma árvore filogenética é composta por nós mais externos — ou folhas — nós e galhos, que representam as diferentes categorias taxonômicas, ou *taxa*, e as relações entre essas (Mount, 2004), como ilustrado na figura 6. 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 TU (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 TU ancestrais. A raiz de uma árvore é o nó que representa o ancestral comum a todas as TU em estudo. A topologia é o padrão de ramificação de uma árvore.

A árvore filogenética pode ser construída com raiz ou sem raiz. Uma árvore sem raiz não assume o conhecimento de um ancestral comum, apenas posiciona os diversos *taxa* entre si para ilustrar a relação (Xiong, 2006; Buso, 2005). Como não há indicação de um ancestral comum, não há uma direção do caminho evolutivo. Em uma árvore com raiz, todas as sequências em estudo têm um ancestral comum a partir do qual um caminho evolutivo leva até os nós.

A maioria dos métodos de construção produz árvores filogenéticas não enraizadas (Buso, 2005). Como é virtualmente impossível determinar o ancestral comum, a raiz de uma árvore pode ser determinada de duas formas. A primeira é o uso de um grupo externo (*outgroup*), que deve ser uma sequência homóloga, mas evolutivamente separada das sequências testadas (Xiong, 2006; Buso, 2005, Mount, 2004). Outro meio para criar a raiz é a abordagem do enraizamento em ponto central, que considera como raiz um ponto central dos dois grupos mais divergentes. Esse tipo de enraizamento assume que a divergência da raiz até as pontas dos galhos é igual e segue a hipótese do relógio molecular. Nessa hipótese supõe-se que as sequências evoluam a uma taxa constante, de forma que a quantidade de mutações acumuladas é proporcional ao tempo evolutivo (Xiong, 2006).

O objetivo 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

O método da máxima parcimônia — do inglês *maximum parsimony* (MP) — 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).

Nos métodos de distância entre vizinhos — do inglês *neighbor joining* (NJ) — a árvore é construída pela aproximação de sequências, com a menor distância entre essas (Polanski e Kimmel, 2007). O NJ começa com uma árvore não resolvida em forma de estrela que agrupa todas as *taxa*, ou clados, em um único nó. Essa árvore é progressivamente decomposta pela seleção de pares com a menor distância corrigida. Isso permite que os *taxa* com as menores distâncias corrigidas sejam unidas como um nó. Após a construção do primeiro nó, um grupo (*cluster*) recém-criado reduz a matriz em um *taxon* e permite que o próximo *taxon* mais relacionado seja agrupado próximo ao primeiro nó. Os ciclos se repetem até que os nós mais internos sejam resolvidos. O *outgroup* deve ser definido com base em conhecimentos externos. Uma das desvantagens do NJ é que o método gera apenas uma árvore, sem comparar outras topologias que poderiam surgir (Xiong, 2006).

Para encontrar uma árvore que suporte e represente os dados genômicos de maneira mais adequada, no método da máxima verossimilhança — do inglês *maximum likelihood* (ML) — 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, em procariotos, e os genes que codificam o rRNA 18S, em eucariotos, são os mais amplamente utilizados.

Essas macromoléculas são consideradas cronômetros moleculares apropriados porque: *i)* estão presente nos ancestrais de todos os seres vivos (16S em procariotos e 18S em eucariotos); *ii)* estão distribuídas universalmente; *iii)* têm função essencial; *iv)* são suficientemente conservadas, mas apresentam regiões de variabilidade interespecies e *v)* apresentam tamanho adequado para permitir uma visão estatisticamente consistente da evolução englobando todos os seres vivos (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).

8. Genes de rRNA 16S

Com o desenvolvimento do pensamento evolutivo (Pace *et al.*, 2012), em 1965, Dubnau e cols. observaram uma conservação entre sequências de rDNA 16S de espécies de *Bacillus* e que é possível estabelecer uma relação entre esses organismos baseando-se nessas sequências. Em conjunto, essas observações permitiram Carl Woese iniciar nos anos 1970, um trabalho pioneiro de classificação de seres vivos (Clarridge, 2004; Woese, 1987; Woese e Fox, 1977). 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). A figura 7 mostra a árvore universal da vida baseada na relação entre as sequências de genes rRNA 16S e 18S.

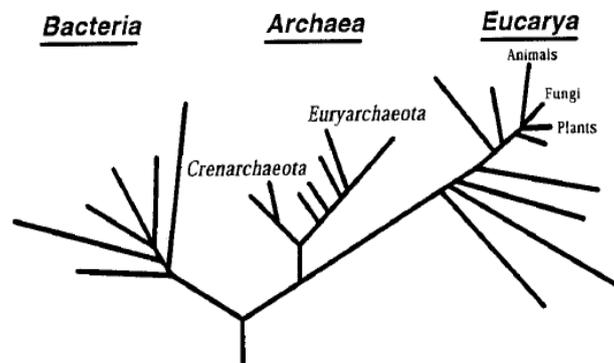


Figura 7. Árvore filogenética universal. As relações entre os três domínios da vida foram baseadas em comparações de sequências de genes de rRNA 16S e 18S, de organismos procariotos e eucariotos, respectivamente. Fonte: adaptado de Woese, 2000.

As sequências de rDNA e 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).

Uma das características que torna o rDNA 16S procariótico imprescindível para a viabilidade celular 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 a subunidade menor do 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 em procariotos na: (i) identificação e classificação de espécies em culturas puras e (ii)

estimativa da diversidade em amostras ambientais por metagenômica (Rajendhran e Gunasekaran, 2011).

À medida que os números de sequências de rDNA 16S depositadas em bancos de dados aumentaram, novos grupos taxonômicos foram descobertos (Baker *et al.*, 2003) e esse fato representa um grande avanço nos estudos de Ecologia de procariotos. 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 genes de rRNA de linhagens dos domínios *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 operóns de genes de rRNA e a heterogeneidade de sequências de 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 rRNA 16S (Baker *et al.*, 2003). Alega-se que os *primers* complementares às regiões conservadas das sequências relativas aos grupos presentes na árvore filogenética universal não são, necessariamente, complementares a todos as sequências de filotipos existentes.

Em adição, para espécies estreitamente relacionadas, o uso do rDNA 16S se mostra limitado. Por exemplo, dentro dos grupos do *B. cereus* e *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, as sequências de rDNA 16S ainda são aceitas como o padrão ouro em estudos filogenéticos e inferências evolutivas, sendo a base para a taxonomia no Manual de Bergey (Rajendran e Gunasekaran, 2011; de Vos *et al.*, 2009; Tringe e Hugenholtz, 2008). Nas últimas décadas, além de determinar as relações filogenéticas entre as Bafes, as sequências de rDNA 16S tiveram papel importante para proposição de novas famílias e gêneros dentro da ordem *Bacillales*.

9. Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos da Universidade de Brasília

As amostras coletadas para o desenvolvimento de uma pesquisa têm imenso valor para os pesquisadores que realizaram a coleta. Desta forma é imprescindível que a comunidade científica desenvolva estratégias para o arquivamento dessas amostras de forma que fiquem adequadamente preservadas e disponíveis para futuras análises (Cary e Fierer, 2014). Com microrganismos a necessidade de armazenar a informação não é diferente. O arquivamento de amostras permite que a comunidade científica reanalise dados publicados e faça uma comparação direta dos resultados.

Existe uma demanda crescente para a disponibilização de recursos biológicos. Tal fato justifica a criação de novos Centros de Recursos Biológicos para o armazenamento de amostras e implementação de novas coleções (OECD, 2001).

A Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (CBafes) da Universidade de Brasília/Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular está localizada no Laboratório de Microbiologia/LaBafes e é especializada em linhagens de interesse científico e com potencial tecnológico para os setores médicos (humano e veterinário), agropecuário, ambiental e

industrial. Atualmente a coleção dispõe de um acervo de 312 linhagens selvagens de Bafes, isoladas do solo do Distrito Federal (SDF) e designadas SDF0001-0312.

As linhagens SDF estão sendo inspecionadas por uma abordagem polifásica para fins taxonômicos. Além de métodos microbiológicos clássicos, o acervo da CBafes está sendo caracterizado por análises filogenética (rDNA 16S e genomas completos), filoproteômica (espectrometria de massa MALDI-TOF), perfil plasmidial, termo resistência de esporos e MET de células vegetativas, esporângios, esporos livres e presença de cristais parasporais (Cavalcante, 2014)

Em conjunto com outras características fenotípicas avaliadas por métodos clássicos e ultraestrutura de esporos por MET (Cavalcante *et al.*, 2014), além da análise de perfil plasmidial (Orem, 2014) esses dados apontam para uma considerável diversidade de linhagens SDF. A filogenia baseada em sequências de rDNA 16S (Orem, 2014) e corroboram esses dados.

O acervo da CBafes inclui ainda a linhagem *B. cereus* FT9, isolada de uma fonte termal, com genoma completo sequenciado (Raiól *et al.*, 2014) e linhagens recombinantes expressando uma proteína de fluorescência verde (GFP), sendo oito *B. thuringiensis* (Parente *et al.*, 2008) e mutantes derivados, além de uma *B. circulans* (Sinotti *et al.*, 2014). Culturas tipo e mutantes de *B. thuringiensis* totalmente curado de plasmídeos (Cry-; hospedeira para expressão heteróloga) provenientes de centros de referência, dentre outras, completam a coleção atual.

II. 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 (Fritze, 2004). Tal fato pode provocar emendas taxonômicas após novos isolamentos.

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 novos gêneros criados para esse propósito e, também, para alocar as novas espécies descritas (Galperin, 2013; de Vos *et al.*, 2009). Conseqüentemente, na literatura especializada, o nome do gênero *Bacillus* está frequentemente associado ao termo “e outras espécies relacionadas”. A compreensão sobre a diversidade do grupo relacionado ao gênero *Bacillus* resultou na ampliação do termo para Bactérias aeróbias formadoras de endósporos ou Bafes.

A necessidade de subdividir o gênero foi reconhecida imediatamente a partir da faixa de conteúdo de G+C no genoma de *Bacillus spp.*, que varia entre 32-50%, em conjunto com a taxonomia baseada apenas em dados fenotípicos (Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004). No entanto, esta adequação da taxonomia está ocorrendo, de maneira mais significativa, graças às análises de sequências de genes de rRNA 16S, que permite reconhecer maior diversidade entre gêneros. Por esta razão, o ritmo de mudança na taxonomia tem sido intenso.

Assim, existe uma demanda crescente para identificação efetiva de Bafes, por razões que incluem conhecimento básico sobre a diversidade, taxonomia apropriada, saúde pública, biodefesa, exploração do potencial tecnológico, dentre outros

III. Objetivos

Visando a contribuição para o conhecimento básico acerca das espécies de Bafes ambientais, este trabalho tem como objetivos gerais a classificação e o estabelecimento das relações filogenéticas das linhagens SDF, bem como avaliar o crescimento em diferentes temperaturas e o conteúdo plasmidial de linhagens selecionadas.

Objetivos específicos:

- Classificar 252 linhagens SDF por análise de sequências de rDNA 16S.
- Estabelecer a relação filogenética entre 192 linhagens SDF com base em sequências consenso de rDNA 16S.
- Estabelecer a faixa de temperatura apropriada ao crescimento de 312 linhagens SDF.
- Em sequências de rDNA 16S, avaliar a presença de sequências assinatura correlacionadas com a faixa de temperatura de crescimento.
- Extrair DNA total para sequenciamento dos genomas completos de oito linhagens SDF selecionadas.
- Realizar um inventário do perfil plasmidial de linhagens selecionadas.
- Correlacionar os dados obtidos.

IV. Metodologia

Declaração de conduta ética. As permissões específicas requeridas para a coleta e isolamento de linhagens de Bafes usadas nesse trabalho foram endossadas pelo CNPq: Autorização de Acesso e Amostra do Patrimônio Genético número 010439/2015-3. A coleta não envolveu espécies ameaçadas ou protegidas.

Amostras de solo e isolamento de linhagens SDF. As 312 linhagens SDF analisadas durante este plano de trabalho estão depositadas na CBafes localizada no UnB/LaBafes. As amostras de solo foram coletadas entre 5 e 8 cm de profundidade em áreas randômicas do Distrito Federal. As linhagens SDF foram isoladas pela adição de 1 g de solo em 10 mL de solução salina (0,9% NaCl, *p/v*) e homogeneizadas em vórtice por 2 min. Um mL da suspensão foi incubada a 65, 70 ou 80 °C por 10 min, seguido de incubação em gelo por 5 min e 0,1 mL foi inoculado em ágar nutriente (1,8% *p/v*; Acumedia), pH 7,2. Após incubação a 28 °C por 1/21 dias, as Bafes foram analisadas quanto a presença de esporos por MCF (Axiolab, Zeiss) com aumento de 1.000X e transferidas para placas com meio fresco. Após incubação nas mesmas condições, colônias isoladas foram reexaminadas quanto a presença de esporos e transferidas para caldo nutriente (Acumedia, pH 7,2, e incubadas a 28 °C e agitação (200 rpm). Após, pelo menos, 90% da população ter esporulado (esporos livres no meio), 1 mL da cultura passou por choque térmico, de acordo com a temperatura de isolamento, por 10 min seguido de gelo por 5 min. Entre 250-300 µL da suspensão de esporos foram transferidos para 5 tubos de preservação contendo tiras de papel filtro. As amostras foram levadas para secar em estufa a 37 °C, os tubos selados com Parafilm™ e armazenados a temperatura ambiente até a utilização.

Crescimento das linhagens SDF para obtenção de DNA total ou plasmidial. Para obtenção de DNA total ou plasmidial, células de uma colônia isolada (meio LB sólido, incubado a 28 °C por 24 a 48 h) das linhagens de interesse foram inoculadas em meio LB líquido

suplementado com L-treonina 20 mM e a cultura foi incubada a 28 °C com aeração (200 rpm). O ciclo celular das linhagens SDF foi acompanhado por MCF (Axioshot, Zeiss).

Análise de faixa de temperatura de crescimento. Células provenientes de colônias isoladas das 312 linhagens SDF (Tabela II) foram inoculadas em meio LB e incubadas a 7 °C, com agitação (200 rpm) por 21 dias ou até que o crescimento fosse observado. Esporos das linhagens SDF foram inoculados em meio LB sólido e incubados a 48 °C, 55 °C e 60 °C. O controle positivo foi realizado a 28 °C.

Amplificação de sequências de rDNA 16S. Células provenientes de colônias isoladas foram crescidas em meio LB, suplementado com L-treonina 20 mM, a 28 °C sob agitação (200 rpm) até atingir A_{600} entre 5 e 6 U. O DNA total foi extraído e purificado utilizando o *kit* Wizard Genomic SV (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e armazenado em água livre de nucleasse a -20 °C até análises futuras. Um termociclador com tampa aquecida MiniCycler (MJ Research, Inc.) foi empregado para amplificar o DNA: 1 µL do DNA total de cada linhagem SDF de interesse (Tabela IV) diluído em 1:100 foi adicionado à mistura de PCR contendo 0,4 pmol de cada *primer* 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'; Lane, 1991 *apud* Hayashi *et al.*, 2004) e 1492R (5' GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'; O'Sullivan *et al.*, 1992 *apud* Hayashi *et al.*, 2004); 1,5 U de Taq (Invitrogen); 0,15 mM de dNTPs; 3mM de MgCl₂; tampão 1X em um volume total de 25 µL. O DNA alvo foi amplificado 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 de 10 min de extensão a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram purificados com o *kit* Qiaquick PCR purification (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Sequenciamento e designação taxonômica. Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram sequenciados pelo método de Sanger no Centro de Genômica do Centro-Oeste (Universidade Católica de Brasília). A qualidade das sequências obtidas foi avaliada com a ferramenta PHRED considerando o valor de corte ≥ 20 . A designação taxonômica das sequências foi realizada com o

auxílio dos aplicativos BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Classifier (Ribosomal Database Project; [http:// http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp)).

Sequências consenso. Com auxílio do programa BioEdit 7.2 (Hall,1999), as sequências antisense foram convertidas em sense utilizando a ferramenta *Reverse Complement*. Ambos os cromatogramas das sequências sense e antisense foram analisados com a ferramenta Chromas (Technelysium Pty Ltd) para determinar as regiões de melhor qualidade. As regiões onde os picos dos cromatogramas não eram bem definidos, em razão da perda de sinal, foram descartadas utilizando a função de edição de sequências encontrada no BioEdit. As sequências resultantes possuíam de 550 a 600 nucleotídeos e foram alinhadas com o ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Inconsistências no alinhamento foram resolvidas pela análise de qualidade do par de base correspondente no cromatograma original. Após a correção das bases, uma sequência consenso para cada uma das 192 linhagens SDF utilizadas neste trabalho (Tabela IV) foi gerada pelo BioEdit.

Construção da árvore filogenética. O alinhamento de sequências por ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) e as análises filogenéticas foram realizadas com o auxílio do aplicativo Ugene 1.30.0 (Konstantin *et al.*, 2012). A história evolutiva foi inferida pelo método de máxima verossimilhança (PhyML) com base no modelo *General Time Reversible* (GTR), com taxa de substituição de categorias igual a 4 e análise estatística *bootstrap* com 1.000 réplicas. A árvore inicial para a busca heurística foi obtida pelo método de distância entre vizinhos. A linhagem de *Clostridium clariflavum* DSM19732 foi usada como grupo externo e sequências de espécies conhecidas foram obtidas no Genbank (NCBI) para serem usadas como referência.

Sequenciamento de genoma total. O DNA total de oito linhagens SDF foi sequenciado em Illumina MiSeq utilizando os serviços da Universidade Católica de Brasília.

Perfil plasmidial de Linhagens SDF com genoma completo. O DNA plasmidial de 23 linhagens SDF (Figura 12) foi obtido por lise alcalina precedida de tratamento com lisozima 4 mg/mL a 37 °C. O DNA plasmidial foi analisado em gel de agarose 0,5%, em tampão TAE 1X, a 4 °C, em paralelo

com DNA plasmidial intacto de *E. coli* H10407 (Crossman *et al.*, 2010) que contém 4 plasmídeos superenovelados com tamanhos de 94,7; 66,6; 5,8 e 5,1 kb. 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 sob agitação, em H₂O destilada, por 24 h. O gel foi documentado com auxílio de câmera fotográfica digital.

V. Resultados e discussão

1. Germinação e crescimento de linhagens SDF em diferentes temperaturas

A germinação de esporos e o crescimento de células vegetativas das 312 linhagens SDF da CBafes foram testados em meio LB líquido e sólido, incubados em uma ampla faixa de temperatura (7-60 °C) e os resultados estão descritos na tabela II. Para todas as condições testadas as 312 linhagens SDF foram incubadas a 28 °C como controle positivo de crescimento. Esta foi a temperatura utilizada para crescimento das Bafes após isolamento, conforme descrito na Metodologia. Os esporos de 9 linhagens SDF não germinaram em nenhuma das condições testadas, inclusive quando incubados a 28 °C (controle positivo): SDF0031; SDF0040; SDF0041; SDF0045; SDF0048; SDF0059; SDF0067; SDF0073 e SDF0081.

Nos testes realizados em temperaturas acima da faixa considerada ideal para bactérias mesófilas foi observado que 113 linhagens (36,21%) foram capazes de germinar e crescer a 55 °C em meio LB sólido. As linhagens que não germinaram a 55 °C foram incubadas a 48 °C. Nesta condição 73 linhagens (23,39%) germinaram e cresceram em meio LB sólido. O período de incubação em ambas as temperaturas foi de 1 a 7 dias. As 113 linhagens que cresceram a 55 °C também foram incubadas a 60 °C, porém, nesta temperatura não foi observado crescimento de nenhuma das linhagens SDF. Estes resultados estão resumidos na figura 8 e detalhados na tabela II.

Adicionalmente, os esporos das 312 linhagens SDF da CBafes foram inoculados em meio LB sólido fresco e incubados a 7 °C. Nesta condição apenas uma linhagem – SDF0068 – foi capaz de germinar após 12 dias de incubação. Análises baseadas na sequência de rDNA 16S desta linhagem indicam que a espécie é *B. simplex* (Tabela II). Após 30 dias de incubação não foi observado crescimento em nenhuma outra linhagem SDF. Após esse período, as mesmas placas inoculadas foram incubadas a 37 °C para verificar a viabilidade dos esporos. Com exceção das linhagens citadas acima (SDF0031; SDF0040; SDF0041; SDF0045; SDF0048; SDF0059; SDF0067;

SDF0073 e SDF0081), houve crescimento de todas as linhagens SDF. Considerando que os esporos eram viáveis e que a ausência de aeração mecânica poderia ter contribuído para o resultado observado, as linhagens SDF foram inoculadas em LB líquido e incubadas a 7 °C sob agitação (200 rpm) até que o crescimento fosse observado por um período máximo de 21 dias. Nestas condições, foi observado crescimento em 108 linhagens (34,61%; Tabela II).

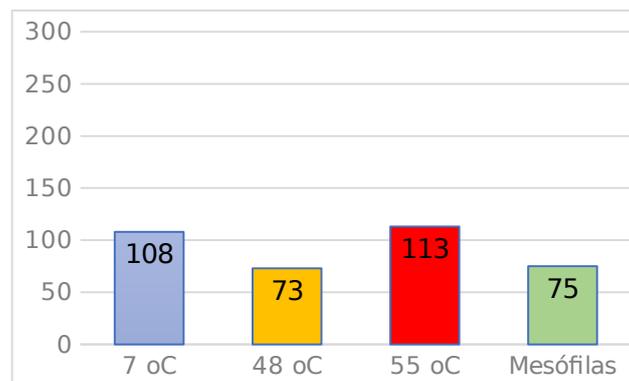


Figura 8. Avaliação de faixa de temperatura para crescimento de linhagens SDF. Das 113 (36,21%) linhagens que foram capazes de germinar e crescer a 55 °C, 73 (23,39%) linhagens a 48 °C e 108 linhagens (34,61%) a 7 °C. Foi observado crescimento apenas na faixa considerada para organismos mesófilos em 75 linhagens (24,03%).

Os testes de faixa de temperatura de crescimento mostram que 66 linhagens SDF são capazes de crescer e germinar entre 7 °C e 48 °C e/ou 55 °C (Tabela II). Resultados preliminares do nosso laboratório mostraram que diversos esporos dessas linhagens resistiram a testes de termo tolerância em calor úmido (autoclavagem) até 130 °C. É importante notar que 10 linhagens – SDF001; SDF0003; SDF0018; SDF0063; SDF0077; SDF080; SDF0105; SDF0114; SDF0115; SDF0136 – tiveram crescimento mais rápido em temperaturas altas do que na temperatura de 28 °C utilizada como controle positivo sendo, portanto, termófilas. Duas linhagens – SDF002 e SDF0029 – cresceram melhor em temperaturas inferiores a temperatura mínima descrita para espécies mesófilas sendo classificadas como psicrófilas. Não houve crescimento em temperaturas superiores aquela do

controle positivo (28 °C) para 75 (24,03%) linhagens que podem ser classificadas como mesófilas (Tabela I).

Considerando que a temperatura no solo sofre flutuações ao longo do dia e das estações do ano e, por isso, durante o ciclo de crescimento os microrganismos precisam de mecanismos para sobreviver a essa flutuação (van Gestel *et al.*, 2013), era esperado encontrar linhagens SDF que fossem capazes de crescer em meio(s) sólido/líquido em faixa ampla de temperatura, ou seja superiores e/ou inferiores à temperatura mínima média comumente descrita em livros de Microbiologia Básica (Madigan *et al.*, al, 2016). Ainda assim, a alta porcentagem de linhagens SDF termotolerantes (59,61%; 186 de 312) e psicotolerantes (35,57%; 111 de 312) testadas é um fato que chama a atenção (Tabela II; Figura 8). É importante ressaltar, também, que dentre as linhagens analisadas quanto ao crescimento na temperatura mínima testada aqui (7 °C), 75 (24,03%; de 312 linhagens) são capazes de crescer igualmente na temperatura máxima onde houve crescimento (55 °C). Isso ressalta a importância em investigar marcadores que possam identificar rapidamente os microrganismos capazes de se adaptar as flutuações de temperatura. Outro fato notável é que, mesmo crescendo a 48 °C e/ou 55 °C, a maioria das linhagens SDF é mesófila, contrariando as classificações clássicas de organismos com relação às temperaturas de crescimento (Madigan *et al.*, al, 2016).

Além do crescimento em diferentes temperaturas, foi observado um comportamento não usual em algumas linhagens incubadas em meio LB a 7 °C/200 rpm. Tais linhagens apresentaram grumos macroscópicos (Figura 9a) na cultura em meio líquido. Sob microscopia ótica com coloração negativa utilizando tinta nanquim, foi possível observar que havia presença da matriz polimérica (EPS, do inglês *extracellular polymeric substances* – Figura 9b e 9c). Quando crescidas em meio LB líquido a 28 °C as mesmas linhagens apresentavam cultura com aparência homogênea e, quando uma alíquota da cultura foi corada com tinta nanquim, a EPS não foi observada sobre microscopia. As 32 linhagens (Tabela I) que apresentaram esse comportamento são: SDF0003;

SDF0022; SDF0029; SDF0030; SDF0037; SDF0156; SDF0157; SDF0165; SDF0168; SDF0170; SDF0213; SDF0221; SDF0224; SDF0230; SDF0232; SDF0235; SDF0244; SDF0245; SDF0248; SDF0249; SDF0257; SDF0272; SDF0277; SDF0282; SDF0283; SDF0284; SDF0285; SDF0286; SDF0287; SDF0288; SDF0292 e SDF0302.

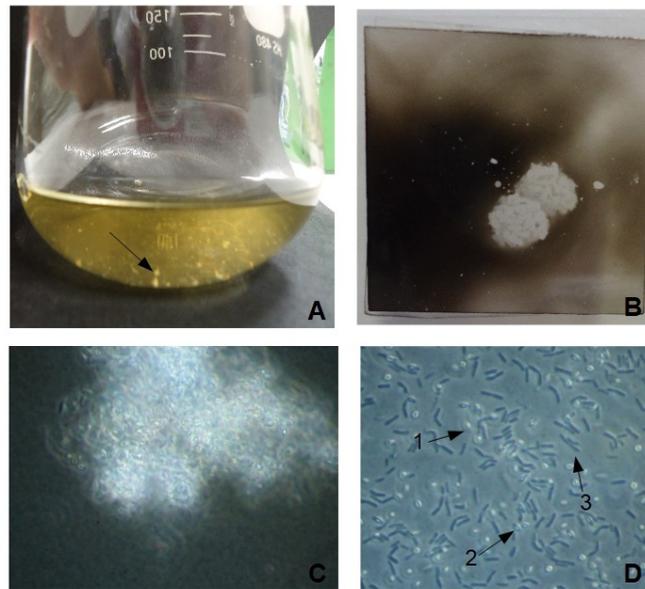


Figura 9. Crescimento de SDF0003 baixa temperatura. Detalhe de cultura de SDF0003 incubada a 7 °C/200 rpm ilustrando o comportamento não usual observado em 32 linhagens SDF: **A)** cultura líquida apresentando grumos (indicados pela seta); **B)** lâmina corada negativamente com tinta naquim evidenciando a formação de EPS; **C)** micrografia (400X) de aglomerado de células em EPS e **D)** as setas indicam: células vegetativas (1), esporângios (2) e esporos livres (3) observadas por MCF (1.000X).

Outro fato interessante foi observado quando 05 linhagens (Tabela I) foram incubadas a 7 °C. Tais linhagens apresentaram uma notável heterogeneidade morfológica na população: estreptobacilos, células isoladas com movimento flagelar, esporângios e esporos livres (Figura 9d). As linhagens SDF0005; SDF0008; SDF0015; SDF0023 e SDF0025 não apresentaram formação de biofilme a 7 °C, mas, quando observadas por MCF, as respectivas culturas continham esporângios e esporos livres. Como mencionado anteriormente, um dos requisitos para a indução a esporulação é a alta densidade populacional (Bàrak *et al.*, 2005; Hilbert e Piggot, 2004), porém na temperatura

inferior testada durante a realização deste trabalho (7 °C) e em baixa densidade populacional foi possível observar a diferenciação celular nas linhagens citadas (Tabela I). É sabido que em culturas microbianas descontínuas não existe um sincronismo no crescimento da população, mas quando crescidas a 28 °C/200 rpm as mesmas linhagens não apresentam tamanha heterogeneidade (dados não mostrados). Do nosso conhecimento, não há relatos sobre esporulação em baixa densidade populacional descritos na literatura. Por se tratarem de células mesófilas, esses resultados podem sugerir que a esporulação induzida em baixas temperaturas seria uma estratégia de sobrevivência nestas condições. As linhagens SDF0001; SDF0002; SDF0004; SDF0011; SDF0013; SDF0019; SDF0026; SDF0027 e SDF0036 não apresentaram esporângios ou esporos livres, mas também exibiam população bastante heterogênea e células com movimento flagelar típico (Tabela I). A expressão de flagelos é um evento característico de final de fase logarítmica, entretanto essas culturas também apresentavam baixa densidade celular. Todas as linhagens SDF com comportamento não usual estão descritas na tabela I e a respectiva classificação por rDNA 16S na tabela II.

Tabela I. Linhagens SDF com comportamento não usual quando incubadas a 7 oC

Linhagens SDF	0001	0002	0003	0004	0005	0008	0011	0013	0015	0019	0022	0023
Biofilme			X								X	
Motilidade	X	X	X	X			X	X		X	X	
Esporulação			X		X	X			X		X	X
Linhagens SDF	0025	0026	0027	0029	0030	0036	0037	0156	0157	0165	0168	0170
Biofilme				X	X		X	X	X	X	X	X
Motilidade		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Esporulação	X			X	X		X	X	X	X	X	X
Linhagens SDF	0213	0221	0224	0230	0232	0235	0244	0245	0248	0249	0257	0272
Biofilme	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Motilidade	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Esporulação	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Linhagens SDF	0277	0282	0283	0284	0285	0286	0287	0288	0292	0302		
Biofilme	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Motilidade	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Esporulação	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

2. Busca por assinatura molecular associada a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas

Dentro do grupo do *B. cereus*, Prüss e cols. (1999) verificaram que os genes de rRNA 16S encontrados em linhagens mesófilas exibem uma sequência assinatura (5' AACATTTTGAACCGCATGGTTC 3'). Dentro deste grupo, linhagens psicrotolerantes contêm uma sequência assinatura adicional (5' AATATTTTGAAGTGCATAGTTC 3'). Segundo estes autores, quando presentes, tais sequências assinaturas estão localizadas entre os nucleotídeos 180 e 201 na sequência senso de rDNA 16S de *B. cereus* ss. As linhagens podem apresentar uma ou as duas sequências assinaturas de acordo com a habilidade em crescer em diferentes temperaturas.

Com base nessas informações, neste trabalho avaliamos se essas sequências assinaturas semelhantes estavam presentes nas linhagens SDF identificadas como membro de *B. cereus* *sl* e em outras espécies relacionadas. Do mesmo modo, verificamos se havia uma assinatura molecular associada à termotolerância no gene de rRNA 16S de linhagens que apresentaram crescimento a 48 °C e 55 °C (Tabela II). Desta forma, realizamos uma busca dentro das sequências de rDNA 16S de linhagens SDF, primeiramente, pelas sequências de assinatura para linhagens mesófilas.

Os resultados dos testes de termo e psicrotolerância descritos na tabela II foram utilizados como critério para a seleção de sequências de rDNA 16S para a investigação da presença de uma assinatura molecular que indicasse a habilidade de uma linhagem em crescer em faixa mais ampla de temperatura que aquela atribuída a linhagens mesófilas (Madigan *et al.*, 2016). Tal informação é de grande utilidade na rápida identificação da presença de Bafes, principalmente, aquelas contaminantes de matéria prima utilizada na indústria alimentícia (Lücking *et al.*, 2013), além de ser mais uma característica para correlacionar sequências de rDNA 16S.

Dentre 253 linhagens SDF com o gene de rRNA 16S sequenciado (Tabela II), 127 possuíam tamanho e região das sequências compatíveis com os dados fornecidos por Prüss e cols. (1999), conforme verificado após alinhamento com a ferramenta ClustaW. A sequência assinatura para

linhagens mesófilas foi detectada nas linhagens SDF0032; SDF0089; SDF0161; SDF0186; SDF0199; SDF0283 e SDF0301, todas classificadas como espécies do grupo do *B. cereus* com base em sequências de rDNA 16S (Tabela II). A figura 10 destaca também a região alinhada. Essas linhagens apresentaram padrão de crescimento diferente nas temperaturas testadas (Tabela II) e faz sentido a assinatura molecular de espécies mesófilas ser encontrada nestas sequências. Entretanto, diversas outras linhagens assinaladas no mesmo grupo não apresentaram essa sequência típica. Tal fato poderia indicar que a assinatura está presente em poucas linhagens de *B. cereus* *sl*, o que reflete os resultados do trabalho de Prüss e cols. (1999) no qual foi utilizado um número baixo de linhagens. A sequência assinatura para psicrotolerância foi encontrada somente na espécie *B. micoydes* ATCC 6462 usada como referência. Além disso não foi encontrado nenhum outro padrão nesta região da sequência de rDNA 16S que pudesse ser relacionada com o crescimento em diferentes temperaturas. Tais resultados levam a crer que os achados obtidos pelo artigo de referência utilizado não podem ser extrapolados para outras espécies de Bafes, embora os mesmos indicassem uma ferramenta rápida para identificação de espécies psicrotolerantes.

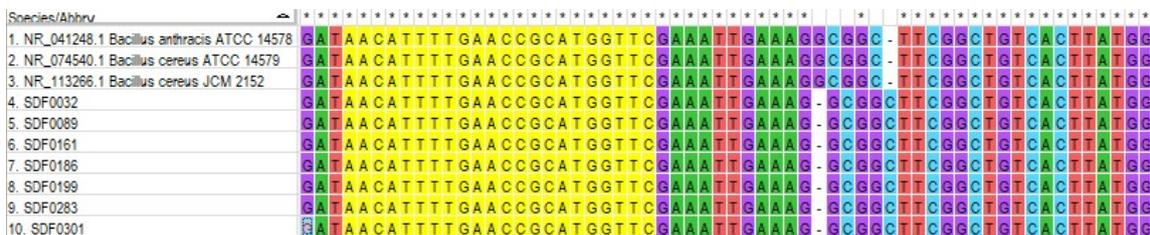


Figura 10. Alinhamento de sequência assinatura de linhagens SDF mesófilas. A assinatura molecular descrita por Prüss e cols. (1999) e tipicamente encontrada para linhagens mesófilas do grupo do *B. cereus* e linhagens SDF estão destacados em amarelo.

Tabela II. Faixa de temperatura de crescimento e designação taxonômica de linhagens SDF

SDF	Designação taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)			SDF	Designação taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)		
	Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55		Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55
0001	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0157	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	+	-	-
0002	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0158	N/D		-	-	-
0003	<i>B. subtilis</i> (97%)	Família	+	+	+	0159	<i>B. cereus</i> (97%)	Ordem	-	+	-
0004	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0160	<i>B. arbutinivorans</i> (97%)	Gênero	+	-	-
0005	<i>L. fusiformis</i> (98%)	Gênero	+	-	-	0161	<i>B. thuringiensis</i> (100%)	Gênero	+	+	+
0006	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	+	-	-	0162	<i>P. susongensis</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0007	<i>B. circulans</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0163	<i>B. australimaris</i> (98%)	Gênero	+	+	+
0008	<i>P. alvei</i> (99%)	Gênero	+	+	-	0164	<i>P. alvei</i> (99%)	Gênero	-	-	-
0009	<i>B. simplex</i> (99%)	Gênero	+	-	-	0165	N/D		+	-	-
0010	<i>B. clausii</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0166	N/D		-	-	-
0011	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	+	+	+	0167	N/D		-	-	-
0012	<i>B. clausii</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0168	<i>P. alvei</i> (85%)	Família	+	-	-
0013	<i>B. safensis</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0169	<i>B. depressus</i> (90%)	Ordem	-	-	-
0014	<i>Brevibacillus borstelensis</i> (96%)	Gênero	-	+	+	0170	N/D		+	-	-
0015	<i>B. oleronius</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0171	<i>B. pumilus</i> (98%)	Ordem	+	+	+
0017	<i>B. altitudinis</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0173	<i>B. pumilus</i> (98%)	Família	-	-	+
0018	<i>B. clausii</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0174	<i>L. sphaericus</i> (100%)	Gênero	-	-	-
0019	<i>L. sphaericus</i> (97%)	Gênero	+	-	-	0175	<i>B. pumilus</i> (97%)	Ordem	-	-	+
0020	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (100%)	Gênero	-	-	-	0176	<i>B. megaterium</i> (99%)	Ordem	-	-	-
0021	<i>B. aryabhattay</i> (94%)	Ordem	-	+	-	0177	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	-	+
0022	<i>B. cereus</i> (100%)	Gênero	+	+	-	0178	<i>B. thuringiensis</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0023	<i>P. alvei</i> (99%)	Família	+	+	-	0179	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0024	<i>B. simplex</i> (95%)	Gênero	+	-	-	0180	<i>L. xylanilyticus</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0025	<i>B. thuringiensis</i> (97%)	Ordem	+	-	-	0181	<i>B. anthracis</i> (100%)	Gênero	-	-	-
0026	<i>B. pumilus</i> (97%)	Ordem	+	+	+	0182	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0027	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	+	+	+	0183	N/D		-	-	-
0028	<i>P. alvei</i> (100%)	Gênero	-	+	-	0184	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0029	<i>B. aryabhatai</i> (99%)	Gênero	+	-	-	0185	N/D		-	-	-
0030	<i>B. thuringiensis</i> (99%)	Gênero	+	-	-	0186	<i>B. anthracis</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0031	S/C					0187	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	-	-
0032	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0188	<i>Brevibacillus agri</i> (99%)	Gênero	-	-	-
0033	N/D		+	-	-	0189	N/D		+	-	-
0034	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0190	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	-	+
0035	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	+	+	+	0191	<i>Terribacillus goriensis</i> (100%)	Gênero	-	-	-
0036	<i>B. altitudinis</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0192	N/D		+	-	-
0037	<i>L. sphaericus</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0193	N/D		-	-	-
0038	N/D		+	+	+	0194	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0039	N/D		+	-	-	0195	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0040	S/C					0196	<i>B. safensis</i> (98%)	Gênero	-	-	+
0041	S/C					0197	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (99%)	Gênero	-	-	-
0042	N/D		+	-	-	0198	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	-
0043	<i>B. safensis</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0199	<i>B. anthracis</i> (97%)	Gênero	-	-	-
0044	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0200	<i>B. cereus</i> (99%)	Ordem	-	+	-
0045	S/C					0201	<i>B. pumilus</i> (97%)	Família	-	+	-

SDF	Designação Taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)			SDF	Designação Taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)		
	Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55		Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55
0046	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0202	<i>B. pumilus</i> (98%)	Ordem	-	-	-
0047	<i>B. megaterium</i> (98%)	Família	-	-	-	0203	<i>B. cereus</i> (90%)	Ordem	-	-	-
0048	S/C					0204	<i>B. altitudinis</i> (97%)	Ordem	-	-	+
0049	<i>B. aryabhatai</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0205	<i>B. altitudinis</i> (97%)	Ordem	-	-	+
0050	<i>B. megaterium</i> (98%)	Família	+	+	-	0206	<i>B. cereus</i> (97%)	Ordem	-	+	-
0051	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	+	+	+	0207	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0052	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	-	-	-	0208	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	+
0053	<i>B. toyonensis</i> (98%)	Gênero	-	-	-	0209	N/D		-	-	+
0054	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	+	-	0210	N/D		-	-	-
0055	<i>B. aryabhatai</i> (98%)	Gênero	-	-	-	0211	N/D		-	-	+
0056	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0212	<i>P. chibensis</i> (96%)	Família	+	-	-
0057	<i>B. megaterium</i> (98%)	Gênero	-	-	-	0213	<i>P. alvei</i> (97%)	Família	+	+	-
0058	<i>B. megaterium</i> (98%)	Gênero	-	-	-	0214	<i>B. luciferensis</i> (98%)	Família	-	-	-
0059	S/C					0215	<i>P. lautus</i> (96%)	Ordem	+	+	-
0060	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	-	-	-	0216	<i>B. senegalensis</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0061	<i>B. thuringiensis</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0217	N/D		+	-	-
0062	<i>S. maltophilia</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0218	<i>Brevibacillus brevis</i> (98%)	Gênero	-	-	+
0063	<i>L. xylanilyticus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0219	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	+	-	-
0064	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	+	-	0220	<i>Brevibacillus laterosporus</i> (99%)	Gênero	+	-	-
0065	<i>B. megaterium</i> (98%)	Gênero	-	+	-	0221	<i>B. cereus</i> (96%)	Ordem	+	+	-
0066	<i>R. pycnus</i> (96%)	Gênero	-	-	-	0222	N/D		-	-	-
0067	S/C					0223	N/D		-	-	-
0068	<i>B. simplex</i> (100%)	Gênero	+	-	-	0224	<i>B. thuringiensis</i> (96%)	Ordem	+	+	-
0069	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0225	<i>B. thuringiensis</i> (100%)	Gênero	-	+	-
0070	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0226	<i>B. cereus</i> (96%)	Ordem	-	+	-
0071	<i>B. pumilus</i> (98%)	Família	-	+	+	0227	<i>P. ginsengagri</i> (100%)	Gênero	+	+	-
0072	<i>B. megaterium</i> (99%)	Família	-	+	-	0228	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0073	S/C					0229	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0074	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0230	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0075	<i>B. simplex</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0231	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0076	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0232	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	+	-	-
0077	N/D		-	+	+	0233	<i>B. aryabhatai</i> (98%)	Gênero	+	+	-
0078	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0234	N/D		-	-	-
0079	<i>B. pumilus</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0235	<i>B. thuringiensis</i> (98%)	Gênero	+	+	-
0080	<i>P. alvei</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0236	<i>B. simplex</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0081	S/C					0237	<i>B. cereus</i> (97%)	Gênero	-	-	-
0082	<i>B. aryabhatai</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0238	N/D		-	-	-
0083	N/D		-	+	+	0239	<i>B. cereus</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0084	<i>B. safensis</i> (98%)	Ordem	-	+	+	0240	<i>P. terrigena</i> (97%)	Gênero	-	-	-
0085	<i>B. thuringiensis</i> (98%)	Ordem	-	-	-	0241	N/D		+	-	-
0086	<i>B. aryabhatai</i> (98%)	Família	-	-	-	0242	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	+	-	-
0087	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	-	-	0243	N/D		-	-	-
0088	N/D		-	+	+	0244	<i>B. megaterium</i> (98%)	Família	+	-	+
0089	<i>B. anthracis</i> (100%)	Gênero	-	-	-	0245	<i>B. megaterium</i> (97%)	Família	+	+	-

SDF	Designação Taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)			SDF	Designação Taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)		
	Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55		Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55
0090	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0246	<i>B. aryabhatai</i> (99%)	Gênero	-	+	-
0091	<i>B. safensis</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0247	N/D		+	-	-
0092	<i>B. pumilus</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0248	<i>B. cereus</i> (100%)	Gênero	+	+	-
0093	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0249	<i>B. cereus</i> (96%)	Gênero	+	+	-
0094	<i>B. megaterium</i> (98%)	Gênero	-	-	-	0250	<i>B. cereus</i> (98%)	Ordem	+	+	-
0095	<i>B. megaterium</i> (100%)	Gênero	-	-	-	0251	<i>L. xylanilyticus</i> (98%)	Gênero	-	-	-
0096	<i>B. megaterium</i> (100%)	Gênero	-	-	-	0252	N/D		-	+	-
0097	<i>B. megaterium</i> (98%)	Família	-	+	-	0253	N/D		-	-	-
0098	<i>B. safensis</i> (98%)	Ordem	-	+	+	0254	<i>B. subterraneus</i> (97%)	Ordem	-	-	-
0099	<i>B. megaterium</i> (97%)	Família	-	-	-	0255	<i>L. xylanilyticus</i> (93%)	Gênero	-	-	-
0100	<i>B. thuringiensis</i> (98%)	Gênero	-	+	-	0256	<i>B. subterraneus</i> (99%)	Gênero	-	-	-
0101	<i>B. cereus</i> (96%)	Família	-	-	-	0257	<i>B. thuringiensis</i> (96%)	Ordem	+	+	-
0102	<i>B. pumilus</i> (96%)	Ordem	-	+	+	0258	N/D		-	-	-
0103	<i>B. safensis</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0259	<i>P. chibensis</i> (98%)	Gênero	-	-	-
0104	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0260	N/D		-	+	-
0105	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0261	N/D		-	-	-
0106	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0262	N/D		-	-	-
0107	N/D		-	+	+	0263	N/D		-	-	-
0108	<i>B. pumilus</i> (94%)	Ordem	-	+	+	0264	N/D		-	-	-
0109	N/D		-	-	-	0265	<i>P. lautus</i> (98%)	Família	+	+	-
0110	<i>B. amyloliquefaciens</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0266	<i>B. pumilus</i> (96%)	Ordem	+	-	-
0111	N/D		-	-	-	0267	N/D		-	-	-
0112	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0268	N/D		-	-	-
0113	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0269	<i>B. amyloliquefaciens</i> (98%)	Gênero	-	+	-
0114	<i>B. pumilus</i> (98%)	Ordem	-	+	+	0270	<i>B. cereus</i> (97%)	Família	+	+	-
0115	<i>B. pumilus</i> (99%)	Família	-	+	+	0271	N/D		+	+	-
0116	<i>B. altitudinis</i> (92%)	Ordem	-	-	-	0272	<i>B. cereus</i> (97%)	Família	+	+	-
0117	<i>B. altitudinis</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0273	<i>B. pumilus</i> (97%)	Ordem	+	+	-
0118	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0274	N/D		-	-	-
0119	<i>B. cereus</i> (100%)	Gênero	-	+	-	0275	N/D		-	-	-
0120	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0276	<i>B. thuringiensis</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0121	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0277	<i>B. megaterium</i> (97%)	Família	+	+	-
0122	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0278	<i>B. cereus</i> (97%)	Ordem	+	+	+
0123	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0279	<i>B. amyloliquefaciens</i> (99%)	Gênero	+	+	+
0124	<i>B. cereus</i> (99%)	Família	-	+	+	0280	<i>B. velezensis</i> (99%)	Gênero	+	+	+
0125	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	-	0281	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	+	+	+
0126	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0282	<i>B. tequilensis</i> (99%)	Gênero	+	-	-
0127	<i>B. siamensis</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0283	<i>B. cereus</i> (100%)	Gênero	+	+	-
0128	<i>B. subtilis</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0284	<i>L. fusiformis</i> (100%)	Gênero	+	-	-
0129	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0285	<i>B. subtilis</i> (99%)	Gênero	+	+	+
0130	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0286	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0131	<i>B. safensis</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0287	<i>B. velezensis</i> (99%)	Gênero	+	+	+
0132	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0288	<i>B. thuringiensis</i> (100%)	Gênero	+	+	+
0133	<i>P. alvei</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0289	N/D		-	-	-

SDF	Designação Taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)			SDF	Designação Taxonômica		Faixa de temperatura de crescimento (°C)		
	Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55		Blast (espécie/id*%)	Classifier	7	48	55
0134	<i>B. safensis</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0290	N/D		-	+	-
0135	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0291	<i>B. aryabhattai</i> (98%)	Família	+	+	-
0136	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0292	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0137	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0293	N/D		+	-	-
0138	<i>B. pumilus</i> (95%)	Ordem	-	+	+	0294	<i>B. thuringiensis</i> (100%)	Gênero	+	-	-
0139	<i>B. pumilus</i> (94%)	Ordem	-	+	+	0295	<i>B. cereus</i> (100%)	Gênero	+	+	-
0140	<i>B. pumilus</i> (97%)	Ordem	-	+	+	0296	N/D		-	-	-
0141	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0297	<i>B. kochii</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0142	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0298	<i>B. megaterium</i> (99%)	Gênero	+	-	-
0143	<i>B. pumilus</i> (94%)	Ordem	-	+	+	0299	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0144	<i>B. simplex</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0300	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0145	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0301	<i>B. thuringiensis</i> (98%)	Gênero	+	-	-
0146	<i>B. pumilus</i> (98%)	Gênero	-	+	+	0302	<i>B. amyloliquefaciens</i> (98%)	Gênero	+	-	-
0147	<i>B. safensis</i> (98%)	Ordem	-	+	+	0303	<i>B. thuringiensis</i> (97%)	Gênero	+	-	-
0148	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0304	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0149	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0305	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0150	<i>B. velezensis</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0306	N/D		+	-	-
0151	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0307	N/D		+	-	-
0152	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0308	<i>B. simplex</i> (97%)	Família	+	-	-
0153	<i>B. altitudinis</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0309	<i>B. megaterium</i> (95%)	Ordem	+	-	-
0154	<i>B. pumilus</i> (99%)	Gênero	-	+	+	0310	<i>B. cereus</i> (99%)	Gênero	+	+	-
0155	<i>B. cereus</i> (100%)	Gênero	-	+	+	0311	<i>B. megaterium</i> (96%)	Família	+	+	-
0156	<i>B. pumilus</i> (100%)	Gênero	+	+	+	0312	<i>B. pumilus</i> (96%)	Família	+	+	+

N/D: não determinado; S/C: sem crescimento.

3. Perfil plasmidial

O perfil plasmidial é uma ferramenta importante para caracterização e investigação da 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 sofrerem cura parcial ou total espontâneas e pelas limitações das técnicas de extração desses elementos extracromossomais. Tais dificuldades refletem na baixa disponibilidade de informações sobre perfil plasmidial de linhagens ambientais na literatura e motiva a inclusão dessa análise neste trabalho. Outra dificuldade que ocorre na análise de um perfil plasmidial complexo em géis de agarose é o fato de os megaplasmídeos serem facilmente degradados durante as etapas de extração e purificação e, também, durante o armazenamento.

Durante este trabalho, os plasmídeos das linhagens SDF (Tabela III) foram extraídos por método de lise alcalina. Como já mencionado, a PC rígida é característica do filo *Firmicutes* necessitando de pré-tratamento com lisozima, ou outra enzima apropriada, até a observação de protoplastos por microscopia ótica. Apesar da atividade da lisozima ser hidrolisar ligações beta-1,4 na cadeia primária de PG (Guariglia-Oropeza e Helmann, 2011; Chassy, 1976), nem todas as linhagens possuem a mesma composição de aminoácidos nas cadeias laterais de PG dificultando o acesso à PC após a ação da enzima (de Vos *et al.*, 2009). Outro fator importante é que algumas linhagens de *B. cereus* *sl*, *B. subtilis* *sl* e *B. megaterium* podem sofrer uma desacetilação da N-acetilglicosamina após a polimerização da PG (Westmacott e Perkins, 1979). Tais características tornam o tratamento com lisozima ineficaz em algumas linhagens (Guariglia-Oropeza e Helmann, 2011; Chassy, 1976). De início, acreditamos que o tratamento ineficaz com a lisozima e, como consequência, a não formação de protoplastos impedia a extração de DNA plasmidial. Entretanto, notou-se que a não obtenção de protoplastos típicos em algumas linhagens não é fator limitante para a extração de DNA plasmidial. Sob microscopia ótica, foi observado um aspecto irregular nas células de algumas linhagens, indicando uma digestão parcial da PG. Em alguns casos, essa

digestão parcial foi suficiente para que a base utilizada formasse poros na membrana citoplasmática e permitisse o extravasamento de DNA plasmidial (Tabela III).

Tabela III. Obtenção de protoplastos e plasmídeos (por lise alcalina) de linhagens selecionadas da CBafes

Linhagem	0001	0002	0003	0004	0005	0006	0008	0009	0010	0011	0012	0013	0014	0015	0016	0017
SDF																
Protoplasto	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
Plasmídeo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Linhagem	0018	0019	0020	0021	0022	0023	0024	0025	0026	0027	0028	0029	0030	0033	0034	0035
SDF																
Protoplasto	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Plasmídeo	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Linhagem	0036	0037	0038	0042	0043	0044	0046	0047	0049	0050	0051	0053	0054	0057	0058	0060
SDF																
Protoplasto	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Plasmídeo	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Linhagem	0061	0062	0064	0065	0066	0067	0068	0069	0070	0071	0072	0074	0075	0076	0079	0080
SDF																
Protoplasto	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Plasmídeo	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
Linhagem	0082	0084	0086	0089	0090	0091	0092	0093	0094	0096	0097	0098	0099	0100	0101	0102
SDF																
Protoplasto	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Plasmídeo	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Linhagem	0103	0104	0105	0106	0108	0110	0112	0113	0114	0115	0117	0118	0119	0120	0121	0122
SDF																
Protoplasto	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Plasmídeo	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Linhagem	0123	0124	0125	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
SDF																
Protoplasto	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Plasmídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Linhagem	149	150	151	152	153	154	FT9									
SDF																
Protoplasto	+	-	-	-	-	-	-									
Plasmídeo	-	-	-	-	+	+	+									

+: observação de protoplastos ou de plasmídeos; -: não observação de protoplastos ou plasmídeos.

Para verificar a metodologia mais eficiente para a extração de DNA plasmidial das linhagens SDF foram feitos diversos testes com a linhagem *B. cereus* FT9 (Raiól *et al.*, 2014) que se mostrou

resistente à lisozima tornando a obtenção de plasmídeos bastante difícil. Desta forma, os testes com essa linhagem em particular poderiam fornecer informações que facilitassem a extração de DNA plasmidial das demais linhagens com PG resistentes a ação da enzima. Primeiramente foi realizado o teste de crescimento em pH ótimo para garantir que o pH usado em nosso laboratório (7,2) estava adequado. Em seguida foram feitas curvas de crescimento em meio BHI, LB e caldo nutriente (CN) para comparar a resposta aos meios mais utilizados no LaBafes. Sabe-se que os três meios testados são complexos, porém o BHI é o mais rico dentre eles, sendo o CN o menos rico. Como esperado, observou-se que os meios BHI e LB promoveram maior densidade celular, medida em A_{600} , e favoreceram um atraso na entrada em fase estacionária quando comparado ao crescimento em caldo nutriente. Assim, os testes seguintes foram feitos apenas nos meios BHI e LB líquidos.

Ainda visando obter uma PG mais acessível a digestão enzimática, foram realizadas novas curvas de crescimento com os meios BHI e LB líquidos suplementados com L-treonina 20 mM. A L-treonina pode afetar as ligações cruzadas entre as cadeias adjacentes de PG de forma análoga à penicilina facilitando o ataque da estrutura pela lisozima (Chassy, 1976). Observou-se que a suplementação com L-treonina não teve influência na curva de crescimento. Quanto à ação da lisozima sobre a PG de *B. cereus* FT9 foram feitos três testes. Avaliou-se: i) se a fase de crescimento afetava a ação da enzima; ii) se o incremento na concentração de L-treonina adicionado ao meio favorecia a digestão de PG com a lisozima, e iii) o tempo ideal de incubação com a enzima.

Para avaliar se a fase de crescimento afetava a ação da lisozima foram coletadas alíquotas de 100 μ L da cultura a partir do início da fase log (A_{600} de 3,5 U) até início de fase estacionária (A_{600} de 16 U). Antes do tratamento com lisozima, a integridade celular foi inspecionada por MCF. Em seguida as células foram centrifugadas e lavadas com H₂O bi-destilada estéril. O tratamento com lisozima 4 mg/mL em tampão STE (Tris, EDTA e sacarose, pH 8,0) foi realizado a 37 °C/12 h. Diferentes concentrações de L-treonina (50, 100 e 200 mM) também foram adicionadas ao meio para investigar o efeito da suplementação com esse aminoácido sobre a ação da lisozima. Os tempos

de incubação também foram avaliados (2, 4, 6, 8 e 12 h). Todos esses testes indicaram que o meio LB líquido, pH 7,2 e suplementado com L-treonina 20 mM era adequado para o crescimento de *B. cereus* FT9. A coleta de células com A_{600} entre 5 e 6 U e o tratamento das mesmas com lisozima 4 mg/mL em tampão apropriado a 37 °C por 6 h foi a melhor condição para o tratamento. Para as linhagens SDF selecionadas (Tabela III) e o *B. cereus* FT9 a lisozima foi adicionada ao tampão de suspensão celular fornecido pelo *kit* Qiaprep (Qiagen). Em nenhuma das condições testadas foram obtidos protoplastos. Entretanto, nas condições ótimas foi possível observar a que a morfologia celular típica de *B. cereus* FT9, em forma de bastão, apresentou contorno irregular, o que indicava que a integridade da estrutura da PC estava comprometida, tornando possível o ataque controlado à membrana citoplasmática para obtenção do extravasamento de DNA plasmidial.

Após os testes de condições ótimas para a extração e purificação do DNA, o perfil plasmidial das linhagens selecionadas (Tabela III) foi avaliado em gel de agarose 0,5%, em paralelo com o DNA plasmidial da *E. coli* ETEC H10407 (Crossman *et al.*, 2010). Essa linhagem foi utilizada como marcador de DNA plasmidial superenovelado por possuir 4 plasmídeos com sequências publicadas e apresentando tamanhos de 94,7; 66,6; 5,8 e 5,1 kb (Figura 11). Dentre as 154 linhagens SDF selecionadas foi obtido protoplasto para 44 (28,57%) e foi possível visualizar plasmídeos em 58 (37,66%).

Além da possibilidade de algumas linhagens não possuírem plasmídeos, a não observação desses elementos extracromossomais pode ser resultado da quebra dos mesmos durante a manipulação, constatada pelo rastro de DNA sem banda definida observada para algumas amostras (Figura 11). Alternativamente, o rendimento da extração/purificação poderia estar aquém do limite de detecção do método, que, nas condições utilizadas, é de 10 ng/banda. Outro fato que também pode ser especulado é a cura, total ou parcial, espontânea de plasmídeos durante a cultura em laboratório, que não considerou, para esta análise, as condições físico-químicas ótimas de crescimento das linhagens SDF. Adicionalmente, a cura plasmidial pode ser explicada pela

decorrência da forte pressão seletiva que existe sobre esses elementos (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008). Para aquelas linhagens SDF em que foi possível detectar a presença de plasmídeos, foi observada uma alta complexidade e diversidade, indicando a importância dessa investigação nas amostras da CBafes (Figura 11).

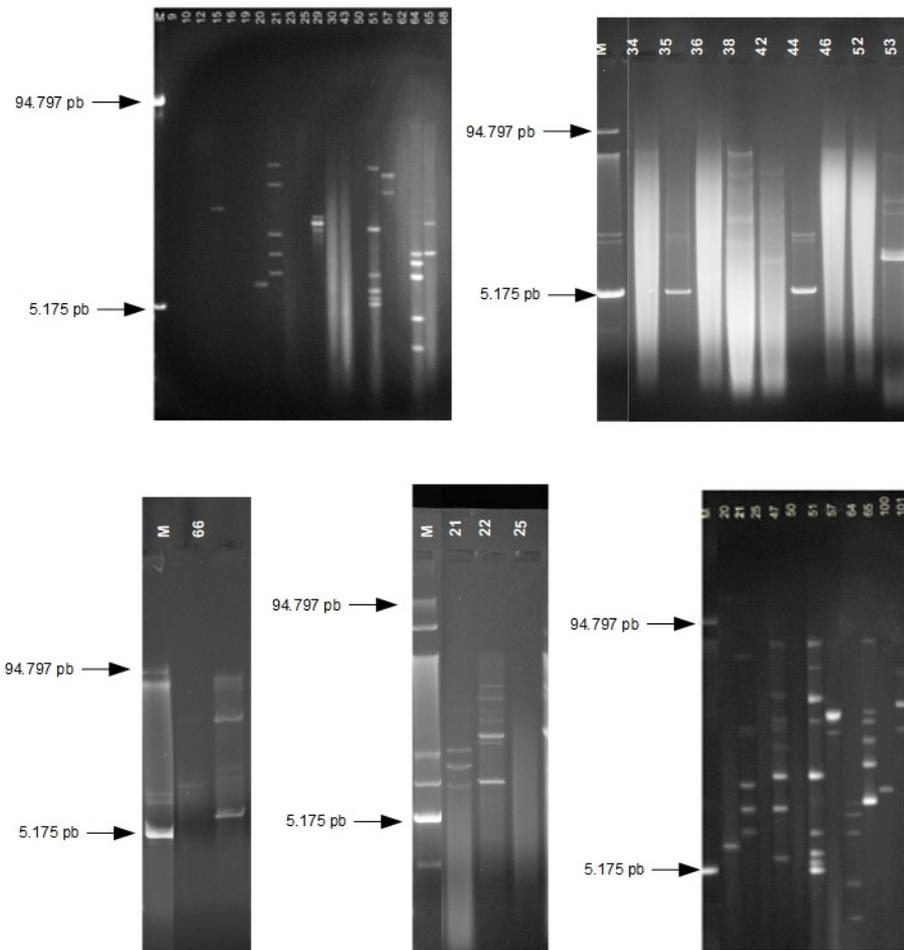


Figura 11. Exemplos de perfil plasmidial de linhagens SDF soladas de solo do DF. O DNA plasmidial foi obtido por lise alcalina precedida de tratamento com lisozima. O DNA plasmidial superenovelado de *E. coli* ETEC H10407, obtido nas mesmas condições, exceto pela ausência de tratamento com lisozima, foi utilizado como marcador de massa molecular (M, indicadas pelas setas). Os números acima das colunas correspondem às designações de linhagens SDF.

A identificação e a classificação de plasmídeos têm sido aspectos importantes nas décadas

recentes para traçar a origem evolutiva e elucidar o papel desses elementos genéticos em 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 aquelas causadas por *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Staphilococcus spp.* (Bosco *et al.*, 2012; Abriouel *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1991; Zuccarelli *et al.*, 1990). Quando se trata do perfil plasmidial de bactérias ambientais existem poucos registros que estão associados às espécies potencialmente patogênicas como o *B. cereus* ss e espécies relacionadas (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008).

Existe uma diversidade significativa nos complexos perfis plasmidiais daquelas linhagens SDF, que foi possível extrair e analisar o DNA plasmidial (Tabela III; Figura 11). Essa característica reforça a relevância desses resultados e corrobora a diversidade encontrada em outras caracterizações realizadas nesse estudo e pelo nosso grupo de pesquisas (Cavalcante, 2014; Orem, 2014).

Foram selecionadas 23 linhagens SDF (Figura 12) que foram submetidas ao sequenciamento completo do genoma (Centro de Genômica do Centro-Oeste, Brasília/ DF e Universidade Loyola, Chicago, IL). Os métodos de sequenciamento de alto desempenho revolucionaram o estudo da genômica, mas trazem um desafio para a montagem dos genomas (Fonseca *et al.*, 2016;). Esses métodos geram fragmentos (*reads*) muito pequenos (algumas centenas de nucleotídeos) quando comparados com os tamanhos obtidos pelo método de Sanger (Koren e Phillipy, 2015). Os fragmentos gerados são, grosso modo, mapeados em um genoma de referência, ou montados como esboços (*drafts*) que precisam de refinamento (Heather e Chain, 2015; Koren e Phillipy, 2015). A presença de elementos extracromossomais, torna a tarefa de montar um genoma ainda mais difícil (Ricker *et al.*, 2012). Nesse sentido, os perfis plasmidiais resolvidos em géis de agarose oferecem suporte para a montagem e anotação dos genomas das linhagens SDF selecionadas para o

sequenciamento dos genomas completos. Sendo assim, é essencial que sejam testadas e aprimoradas novas técnicas para lizar de maneira controlada a resistente PC de bactérias Gram positivas, obter preparações de DNA plasmidial com qualidade adequada para as diversas análises e, principalmente, atender a complexidade estrutural (plasmídeos circulares e lineares) e a ampla faixa de massa molecular observadas para esses elementos extracromossomais.

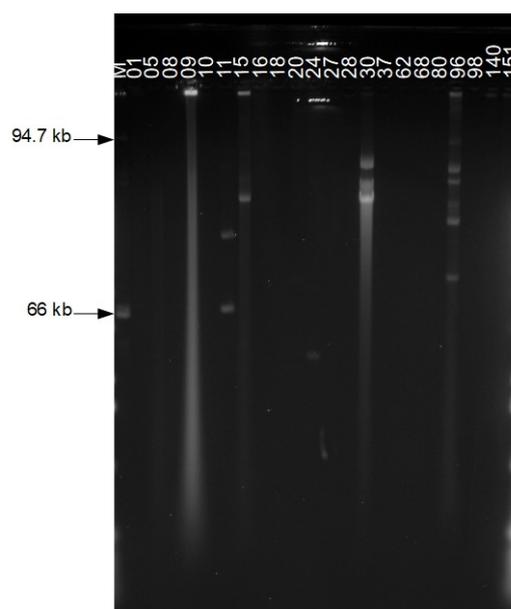


Figura 12. Perfil plasmidial de linhagens SDF isoladas de solo do DF. O DNA plasmidial das linhagens SDF e de *E. coli* ETEC H10407 (M, indicadas pelas setas) foi obtido nas mesmas condições descritas na Figura 11. Os números acima das colunas correspondem às designações de linhagens SDF com genoma completamente sequenciado.

4. Genes de rRNA 16S de linhagens SDF

Durante a extração de DNA total notou-se que algumas linhagens SDF apresentaram limitações no crescimento. Tal aspecto pode ser devido à falta de conhecimento acerca das condições ótimas para o cultivo dessas linhagens, que não foram testadas até o momento. Outro aspecto observado durante a extração de DNA foi o excesso de viscosidade após a lise de parede

celular de algumas linhagens. Como mencionado anteriormente, uma das principais características do filo *Firmicutes* é a parede celular espessa. Além disso algumas linhagens produzem estruturas externas à parede celular, tais como cápsula e/ou camada S. Provalvemente, o excesso de *debris* celulares que é gerado após a lise da PC e bloquearam os poros da coluna de cromatografia de afinidade do *kit* utilizado impedindo a purificação do DNA.

Das 312 linhagens SDF testadas durante este trabalho, 50 apresentaram limitações durante o crescimento e 9 apresentaram um excesso de viscosidade que impediu a purificação adequada de DNA. No momento estas limitações foram contornadas e o DNA total foi extraído e purificado e o sequenciamento está em curso. As 252 linhagens analisadas (Tabela II) foram submetidas à extração, purificação de DNA total e amplificação empregando-se os *primers* universais para o domínio *Bacteria* 27F e 1492R (Lane, 1991; O'Sullivan et al., 1992 *apud* Hayashi et al., 2004). Ambas as fitas senso e antisenso foram sequenciadas pelo método de Sanger no Centro de Genômica do Centro Oeste. As 506 sequências resultantes com índice PHRED ≥ 20 em pelo menos 400 nucleotídeos foram submetidas à designação taxonômica por BLAST (NCBI) e Classifier (RDP).

A maior parte das espécies foram alocadas no gênero *Bacillus* (218; 86,16%) seguido pelo gênero *Paenibacillus* (16; 6,32%). Espécies alocadas nos gêneros *Lysinibacillus* (9; 3,56%), *Brevibacillus* (7; 2,76%), *Terribacillus* (1; 0,40%) e *Rummeliibacillus* (1; 0,40%) também estavam presentes entre as espécies analisadas (Figura 13 e Tabela IV).

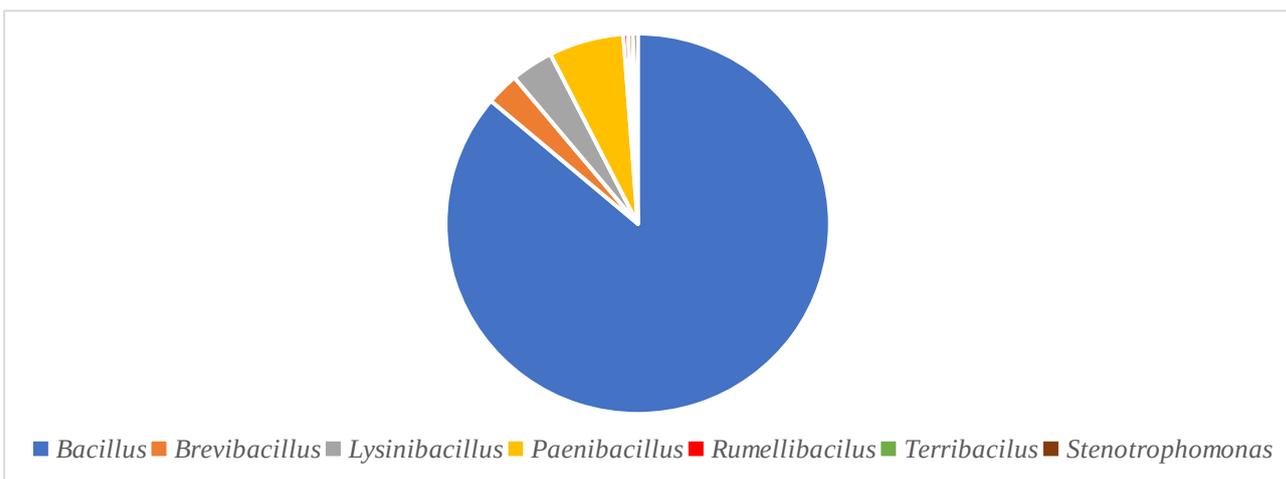


Figura 13. Distribuição de linhagens SDF em nível de gênero. As espécies alocadas no gênero *Bacillus* compõem a maioria entre as linhagens SDF.

Dentre as linhagens alocadas no gênero *Bacillus*, espécies do grupo do *B. pumilus* foram predominantes (92; 42,20%) seguidas de espécies do grupo do *B. cereus* (56; 25,69%); *B. megaterium* (39; 17,89%) e *B. subtilis* (12; 5,50%). Outras espécies de *Bacillus* representaram (19) 8,72% do total (Figura 14; Tabela IV). É importante ressaltar que, embora a espécie *B. aryabhattachay* esteja incluída no grupo do *B. megaterium* neste trabalho, as duas espécies não são estreitamente relacionadas como acontece com as espécies pertencentes aos grupos de *B. cereus*; *B. subtilis* e *B. pumilus*. Enquanto as espécies dos grupos mencionados podem compartilhar até 99% de identidade em nível de genoma (Liu *et al.*, 2013; Kolsto *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Fritze, 2004); as espécies *B. megaterium* e *B. aryabhattachay* compartilham menos de 70% de identidade. O que aproxima as duas últimas espécies é a identidade nas sequências de rDNA 16S que pode chegar a 99,7% (Shivaji *et al.*, 2009).

Como foi mencionado anteriormente, as linhagens SDF depositadas na CBafes estão sendo caracterizadas por uma estratégia polifásica para fins taxonômicos. Por serem complementares, as análises fenotípicas realizadas por nosso grupo de pesquisa são fundamentais para uma interpretação adequada dos dados de filogenia.

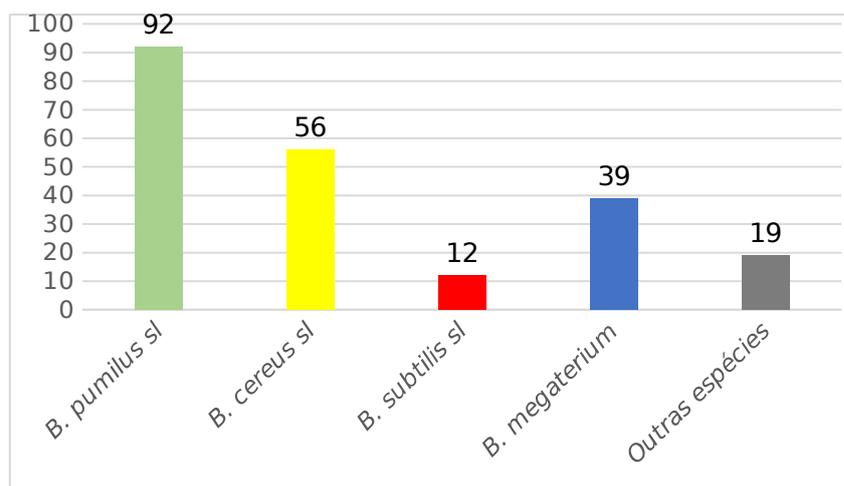


Figura 14. Espécies mais abundantes dentro do gênero *Bacillus*. As espécies do grupo do *B. pumilus* formam a maior parte da CBafes seguidas por espécies do grupo do *B. cereus*.

Os resultados de coloração diferencial de Gram, morfologia e localização de endósporos, esporângio deformado ou não, testes bioquímicos, análises de filoproteômica, ultraestrutura de esporos, dentre outras, auxiliam na resolução de discrepâncias, que podem surgir na comparação das sequências de linhagens SDF com os bancos de dados. Em alguns casos foi possível observar inconsistência entre os resultados fenotípicos e a comparação com sequências depositadas nos bancos de dados. Tal fato leva a refletir sobre a confiabilidade das sequências depositadas nestes dados. Algumas das espécies utilizadas para comparação de sequências rDNA 16S, com maior identidade identificadas pelo BLAST são originárias de estudos independente de cultivo e, portanto, sem disponibilidade sobre características fenotípicas que possam corroborar os resultados. Outro fato que não pode ser ignorado é que podem ocorrer erros durante o sequenciamento, o que limita a determinação precisa da espécie analisada. Para minimizar essa limitação, no presente estudo foi realizado o sequenciamento de ambas as fitas de DNA que foram utilizadas para a geração da sequência consenso.

Exemplificando a importância da caracterização polifásica, pode-se citar as linhagens SDF0005; SDF0019; SDF0037 e SDF0063 que produzem um endósporo esférico, com posição terminal em um esporângio deformado (resultados não mostrados). Estas

características correspondem às descritas para espécies do gênero *Lysinibacillus*, corroborando os resultados apresentados na tabela II. Em adição, dados obtidos em trabalhos paralelos (por espectrometria de massa MALDI-TOF) por nosso grupo de pesquisa também indicam que a linhagem SDF0005 pertence ao gênero *Lysinibacillus* (dados não mostrados). As linhagens membros do gênero *Paenibacillus* também apresentam esporângio deformado, porém a morfologia do endósporo é oval e a localização, geralmente, central (de Vos, 2009). Tais características foram observadas nas linhagens SDF0008 e SDF028 (dados não mostrados) e estão em concordância com os resultados da tabela II. Por outro lado, a linhagem SDF0030 apresentou uma estrutura semelhante a um cristal parasporal típico de *B. thuringiensis*, quando analisada em paralelo por MET (Calvalcante, 2014; Cavalcante *et al.*, 2104), corroborando a classificação baseada em sequência do gene de rRNA 16S, que apontou uma alta identidade (99%) com *B. thuringiensis*. As linhagens SDF0021 e SDF0029 possuem alta identidade com *B. megaterium* e este resultado é corroborado pela morfologia dos esporos, observados por MET (Calvalcante, 2014; Cavalcante *et al.*, 2104) e pela indicação do gênero, por MALDI-TOF MS (dados não mostrados).

O estabelecimento do gene de rRNA 16S como marcador molecular permitiu a criação de um sistema taxonômico hierárquico baseado em um único gene. Análises incluindo outros marcadores e comparações com genomas completos afirmaram a filogenia baseada em rDNA 16S como o pilar da taxonomia procariótica (Kämpfer e Glaeser, 2012). A identificação baseada em sequências de rDNA 16S pode ser complementada por outras análises genotípicas em conjunto com caracterização fenotípica permitindo uma visão mais holística da diversidade de procariotos.

Genes de rRNA 16S apresentam cerca de 1.600 pb e compreendem regiões altamente conservadas e outras variáveis. Estes genes são considerados bons cronômetros moleculares pela ubiquidade, função essencial e tamanho adequado que permite estudos evolutivos

robustos (Maughan e Van der Auwera, 2011; Clarridge, 2004; Woese, 1987).

Tabela IV. Distribuição de espécies de linhagens SDF

Gênero	Espécie	Linhagem SDF
<i>Bacillus</i>	<i>B. arbutinivorans</i>	0160 0006; 0022; 0025; 0030; 0032; 0053; 0061; 0085; 0089; 0100; 0101; 0119; 0124; 0155; 0159; 0161; 0178; 0181; 0182; 0184; 0186; 0194; 0199; 0200; 0203; 0206; 0219; 0221; 0224; 0225; 0226; 0229; 0232; 0235; 0237; 0239; 0248; 0249; 0250; 0272; 0276; 0278; 0283; 0286; 0288; 0294; 0295; 0299; 0300; 0301; 0303; 0304; 0305; 0310
	<i>B. cereus sensu lato</i>	
	<i>B. circulans</i>	07
	<i>B. clausii</i>	0010; 0012; 0018
	<i>B. depressus</i>	0169
	<i>B. firmus</i>	0216
	<i>B. kochii</i>	0297
	<i>B. luciferensis</i>	0214 0021; 0029; 0047; 0049; 0050; 0051; 0054; 0055; 0056; 0057; 0058; 0064;
	<i>B. megaterium</i>	0065; 0069; 0072; 0074; 0075; 0076; 0078; 0082; 0086; 0094; 0095; 0096; 0097; 0099; 0118; 0176; 0228; 0233; 0242; 0244; 0245; 0246; 0277; 0291; 0298; 0309; 0311
	group	
	<i>B. muralis</i>	0308
	<i>B. oleronius</i>	0015 0001; 0002; 0004; 0011; 0013; 0017; 0026; 0027; 0034; 0035; 0036; 0043; 0044; 0046; 0052; 0060; 0070; 0071; 0079; 0084; 0087; 0090; 0091; 00952; 0093; 0098; 0102; 0103; 0104; 0105; 0106; 0108; 0112; 0113; 0114; 0115; 0116; 0117; 0120; 0121; 0122; 0123; 0125; 0126; 0129; 0130; 0131; 0132; 0134; 0135; 0136; 0137; 0138; 0139; 0140; 0141; 0142; 0143; 0145; 0146; 0147; 0148; 0149; 0151; 0152; 0153; 0154; 0156; 0157; 0163; 0171; 0173; 0175; 0177; 0179; 0187; 0190; 0196; 0198; 0201; 0202; 0204; 0205; 0207; 0208; 0230; 0231; 0266; 0273; 0281; 0292; 0312
	<i>B. pumilus sensu lato</i>	0009; 0016; 0024; 0068; 0075; 0144; 0236; 0308 0254; 0256
	<i>B. simplex</i>	
	<i>B. subterraneus</i>	
	<i>B. subtilis sensu lato</i>	0003; 0110; 0127; 0128; 0150; 0,269; 0279; 280; 282; 285; 287; 302
	<i>B. borstelensis</i>	0014
	<i>B. brevis</i>	0218
	<i>B. laterosporus</i>	0020; 0195; 0197; 0220
	<i>L. fusiformis</i>	0005; 0284
	<i>L. sphaericus</i>	0019; 0037; 0174; 0251
	<i>L. xylanilyticus</i>	0063; 0180; 0255
	<i>P. alvei</i>	0008; 0023; 0028; 0080; 0133; 0164; 0168; 0213; 0215
<i>P. chibensis</i>	0212; 0259	
<i>P. lautus</i>	0213; 0227; 0265	
<i>P. susongensis</i>	0162	
<i>P. terrigena</i>	0240	
<i>Rummeliibacillus</i>		
<i>R. pycnus</i>	0066	
<i>Terribacillus</i>		
<i>T. goriensis</i>	0191	

Embora os estudos baseados em sequências de rDNA 16S sejam amplamente utilizados, a metodologia recebe críticas acerca da superestimação de uma única molécula como marcador para estabelecer a história evolutiva das espécies. (Ludwig, 2007). A presença de

múltiplas cópias destes genes no genoma é fator limitante para o uso desses marcadores na identificação de espécies, principalmente em organismos altamente relacionados (Rajendhran e Gunasekaran, 2011; Dahllöf *et al.*, 2000). Existe ainda uma discussão sobre os chamados *primers* universais que podem não ser complementares a todos os grupos existentes nos bancos de dados (Baker *et al.*, 2003).

Apesar das críticas, as sequências de rDNA 16S ainda constituem uma ferramenta valiosa para a identificação de gêneros e em alguns casos de espécies de microrganismos procarióticos. O avanço em estudos moleculares e aprimoramento das técnicas estão aumentando a quantidade de informação disponível em bancos de dados o que torna as sequências de rDNA 16S fundamentais para guiar decisões futuras nos projetos de pesquisa (Tringe and Hugenholtz, 2008).

5. Construção de árvores filogenéticas

Para a análise filogenética proposta neste trabalho foram incluídas, inicialmente, sequências de referência de genes de rRNA 16S, obtidas no Genbank (NCBI; Figura 15)

As sequências consenso de rDNA 16S obtidas para 192 linhagens SDF depositadas na CBafes (Tabela IV) e as sequências de referência foram alinhadas com a ferramenta ClustalW, a história evolutiva foi inferida pelo método de máxima verossimilhança (PhyML) com base no modelo *General Time Reversible* (GTR), e análise estatística *bootstrap* com 1.000 réplicas. A árvore resultante está representada na figura 15.

Tabela V. Linhagens SDF selecionadas para análise filogenética

Gênero	Espécie	Linhagem SDF	
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus sensu lato</i>	6; 22; 30; 32; 53; 61; 89; 119; 155; 159; 161; 178; 184; 186; 194; 199; 206; 219; 226; 229; 235; 237; 249; 250; 257; 276; 278; 283; 286; 288; 294; 295; 299; 300; 301; 303; 304; 305; 310	
	<i>B. circulans</i>	07	
	<i>B. clausii</i>	10; 18	
	<i>B. kochii</i>	297	
	<i>B. megaterium</i> group	29; 47; 49; 50; 51; 54; 55; 57; 64; 65; 69; 74; 76; 78; 82; 86; 94; 95; 96; 97; 99; 118; 176; 228; 233; 246; 277; 298; 309; 311	
	<i>B. oleronius</i>	15	
		01; 02. 04; 11; 13; 17; 26; 27; 34; 35; 36; 43; 44; 46; 52; 60; 70; 71; 79; 84; 87; 91; 92; 93; 98; 102; 103; 104; 105; 106; 112; 115; 117; 120; 121; 122; 123; 125; 126; 127; 129; 130; 131; 132; 134; 135; 136; 137; 138; 141; 142; 143; 145; 146; 147; 148; 149; 151; 152; 156; 157; 163; 173; 177; 179; 187; 190; 196; 198; 201; 204; 205; 230; 231; 281; 292; 312	
	<i>B. simplex</i>	9; 16; 68; 75; 144; 236; 308	
	<i>B. subtilis sensu lato</i>	03; 110; 150; 279; 280; 282; 285; 287; 302	
	<i>Brevibacillus</i>	<i>B. borstelensis</i>	14
		<i>B. laterosporus</i>	20; 197; 220
	<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. fusiformis</i>	05; 284
		<i>L. sphaericus</i>	19; 37; 174
<i>Paenibacillus</i>	<i>L. xylanilyticus</i>	63	
	<i>P. alvei</i>	08; 28; 80; 133; 164; 213	
	<i>P. chibensis</i>	259	
	<i>P. lautus</i>	215; 265	
	<i>P. susongensis</i>	162	
<i>Rummeliibacillus</i>	<i>P. terrigena</i>	240	
	<i>R. pycnus</i>	66	
<i>Terribacillus</i>	<i>T. goriensis</i>	191	

Pode-se observar a partir da árvore mostrada na figura 15 que, em uma pequena amostragem de Bafes de solo, já existe grande diversidade de linhagens. Tal diversidade é corroborada por filoproteômica por MALDI-TOF MS e MET realizados pelo grupo do LaBafes (dados não mostrados; Cavalcante, 2014).

A árvore filogenética (Figura 15) está organizada em 8 divisões principais designadas como A, B, C, D, E, F, G e H.

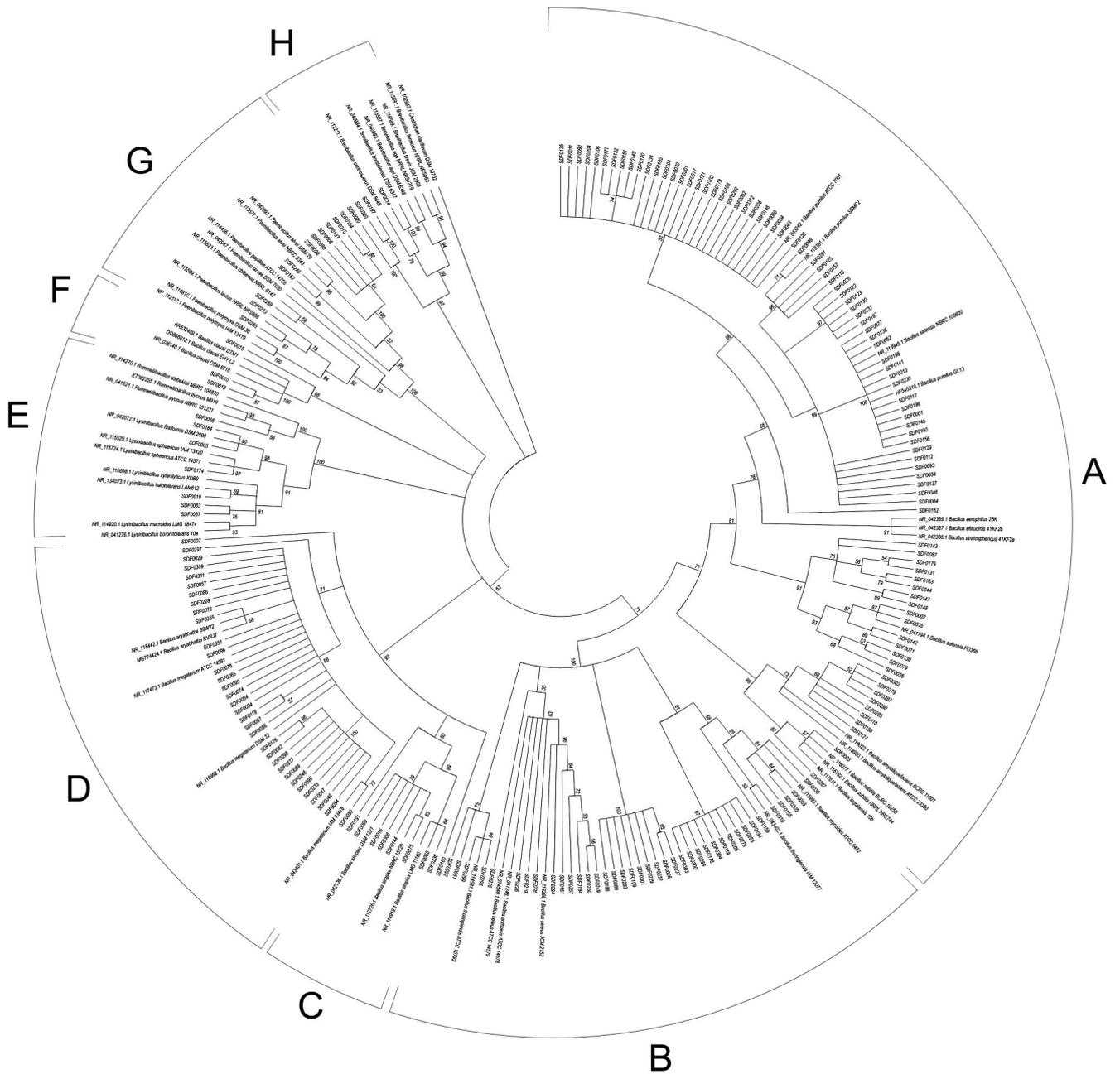


Figura 15. Relação filogenética entre 192 linhagens. A história evolutiva baseada em sequências de rDNA 16S foi inferida por máxima verossimilhança. A árvore resultante após análise bootstrap com 1000 réplicas teve os galhos com valores de suporte menores que 50% condensados.

Os grupos do *B. pumilus* e *B. subtilis* estão representados na divisão A (Figura16). Ambos os grupos são compostos por espécies altamente relacionadas e também são relacionados entre si, como pode ser observado pelo agrupamento na figura 15. O *B. subtilis* *sl* é composto pelas espécies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. tequilensis*, *B. mojavensis*, *B. atropheus* and *B. vallismorthis* (Wang *et al.*, 2007). O *B. pumilus* *sl* é formado por *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* e *B. aerophilus* (Liu *et al.*, 2013).

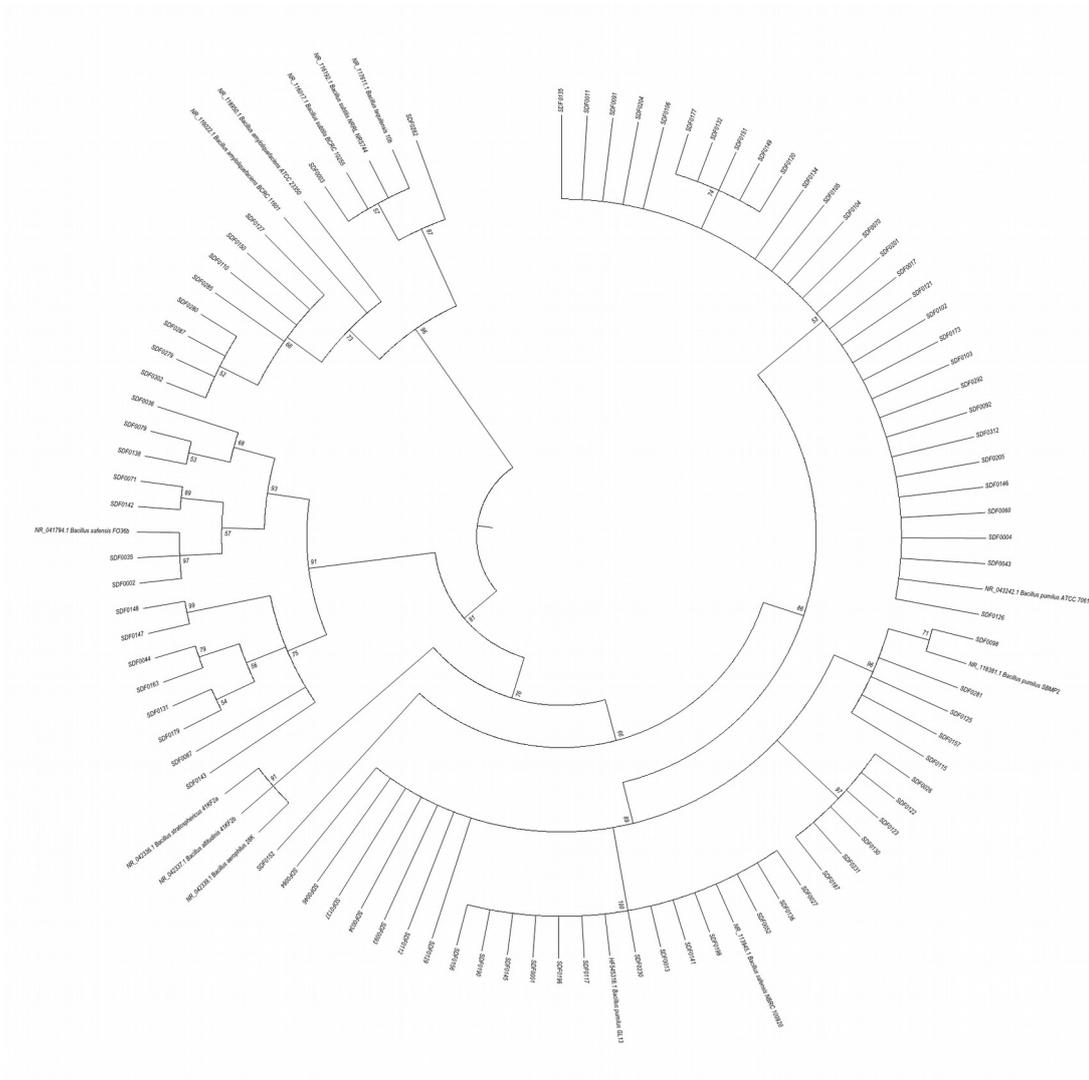


Figura 16. Relação filogenética entre as linhagens pertencentes a *B. pumilus* *sl* e *B. subtilis* *sl*.

Os grupos representados são compostos por espécies altamente relacionadas e são relacionados entre si. Os números das linhagens SDF e de referência estão indicados nos galhos. O método de construção está descrito na figura15.

A divisão B (Figura 17) compreende o *B. cereus* *sl* onde as espécies são diferenciadas, principalmente, pelo conteúdo plasmidial, já que os genomas podem partilhar 99% de identidade (Kolsto *et al.*, 2009; Fritze, 2004).



Figura 17. Relação filogenética entre as linhagens pertencentes a *B. cereus* *sl*. O grupo representado é composto por espécies altamente relacionadas. Os números das linhagens SDF e de referência estão indicados nos galhos. O método de construção está descrito na figura15.

A divisão C agrupa as espécies altamente relacionadas ao *B. simplex* (Figura 18a), a divisão B aloca as espécies assinaladas como *B. megaterium* e *B. aryabhata* (Figura 18b) e a divisão E é composta por membros pertencentes aos gêneros *Lysinibacillus* e *Rummeliibacillus* (Figura 18c).

As SDF identificadas como *B. clausii* (Tabela IV; SDF0010 e SDF0018) estão alocadas na divisão F (Figura 18d). Era esperado que essas espécies fossem mais relacionadas com outras espécies do gênero *Bacillus*, porém o agrupamento na árvore filogenética (Figura 15) mostra que as mesmas estão mais relacionadas com outros gêneros da mesma família ou da família *Paenibacillaceae*. Considerando a complexidade em identificar *Bacillus spp.*, muitas linhagens podem estar mal alocadas no gênero (de Vos *et al.*, 2009). O *B. clausii* pode ser uma dessas espécies, já que não é filogeneticamente próxima das espécies tipo do gênero, *B. subtilis*, de acordo com o Manual de Bergey.

As divisões G (Figura 19a) e H (Figura 19b) são compostas por espécies alocadas nos gêneros *Paenibacillus* e *Brevibacillus*, respectivamente. Embora tais gêneros pertençam à família *Paenibacillaceae*, o agrupamento não ocorreu conforme o esperado. É possível observar na figura 15 que a divisão G aparece mais relacionada a espécies da família *Bacillaceae*. Essa discrepância no agrupamento possivelmente se deve ao limite de resolução de fragmentos relativamente pequenos de rDNA 16S.

Existem diversos estudos ecológicos que avaliam a estrutura de comunidades de solo. Este trabalho, em particular, não tem este objetivo, principalmente devido aos vieses que podem surgir em estudos dependentes de cultura. Sabe-se que em abordagens ecológicas, o crescimento de alguns organismos pode se sobrepor ao de outros, portanto, alguns grupos podem ser sub ou super-representados (Youssef e Elshaned, 2009; Zhang e Xu, 2008; Janssen, 2006).

Em abordagens dependentes de cultura apenas 0,1 a 1% das espécies de microrganismos 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 independentes.

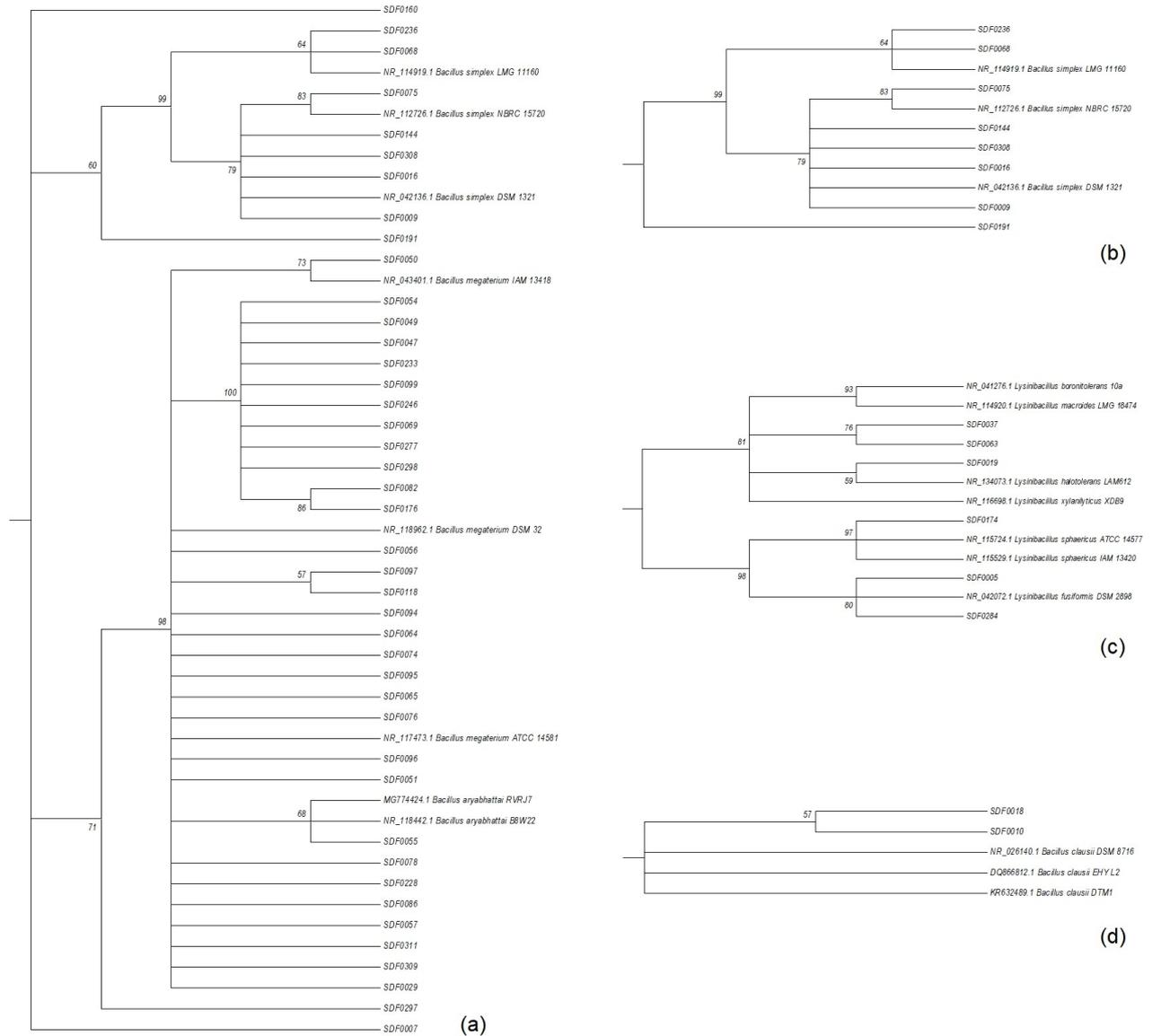


Figura 18. Linhagens SDF alocadas em gêneros da família *Bacillaceae*. Linhagens SDF assinaladas como *B. megaterium* e *B. aryabhatai* (a); *Lysinibacillus* spp. (b) e *B. clausii*. Os números que designam as linhagens SDF e de referência estão indicados nos galhos. O método de construção está descrito na figura15.

Estudos de diversidade independentes de cultivo mostram que o solo exibe uma estrutura de comunidade estável (Youssef e Elshaned, 2009; Zhang e Xu, 2008; Janssen, 2006). 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*. Essa estabilidade é notável, ainda que considerando as variações existentes no solo de diferentes locais de coleta de amostras.

Em um trabalho de 2006, Janssen analisou 32 bibliotecas construídas a partir da amplificação de genes de rRNA 16S de amostras de solo coletadas em diversos países. O filo *Firmicutes* representa, em média, 2% da composição das bibliotecas analisadas, sendo os gêneros formadores de endósporos *Bacillus* (aeróbio) e *Clostridium* (anaeróbio) os de maior representatividade. Essa baixa abundância de membros do filo é reproduzida por outros estudos de avaliação de diversidade de solos (Youssef e Elshaned, 2009; Zhang e Xu, 2008)

Em 2009, Youssef e Elshaned apresentaram resultados da construção de cinco grandes bibliotecas de clones e analisaram tanto a abundância quanto a riqueza dos membros dos filos mais representativos. Em concordância com outros estudos de diversidade bacteriana em solos, os autores observaram que existe uma baixa abundância dos membros do filo *Firmicutes* nas amostras. Por outro lado, esse filo era o que apresenta maior riqueza de microrganismos. Já foi postulado que como cada espécie utiliza recursos diferentes e ocupa nichos distintos na comunidade, conseqüentemente, 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 sequências de genes rRNA 16S se dá pela dificuldade em lisar células vegetativas e, principalmente, 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 das amostras de 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 serem utilizados como referência para outros estudos de avaliação de diversidade das comunidades microbianas.

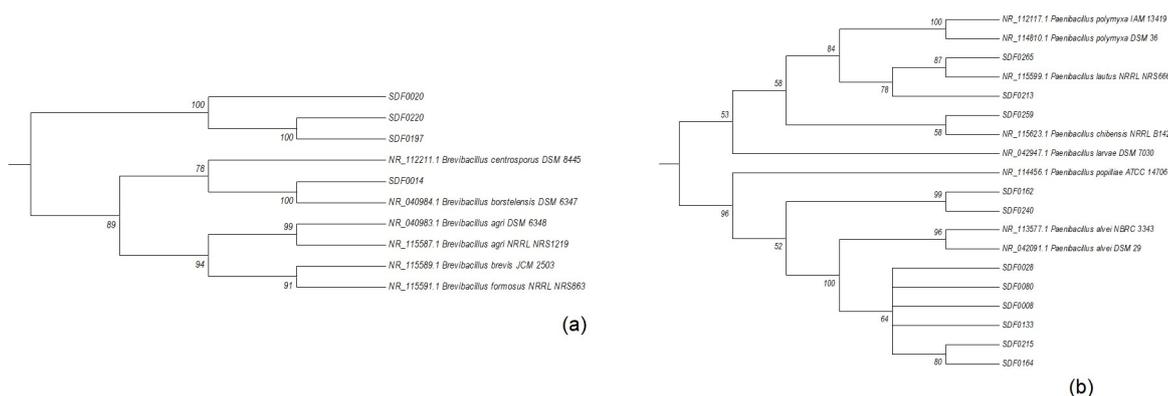


Figura 19. Linhagens SDF alocadas na família *Paenibacillaceae*. Linhagens SDF alocadas em *Brevibacillus* spp. (a) and *Paenibacillus* spp. (b). Os números que designam as linhagens SDF e de referência estão indicados nos galhos. O método de construção está descrito na figura15.

VI. Conclusão

Neste trabalho, foi analisada a filogenia de linhagens SDF com base na comparação de sequências consenso de rDNA 16S e genomas completos de linhagens selecionadas. A presença de uma assinatura para psicrotolerância e/ou termotolerância, dentro da sequência de rDNA 16S, foi verificada e os resultados obtidos foram relacionados com o crescimento em diferentes temperaturas. Foi realizado, ainda, um inventário do perfil plasmidial de linhagens selecionadas.

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.

Em estudos sobre diversidade microbiana, os grupos mais estudados provavelmente aparecem com maior número de taxa, por exemplo *Bacillus*, enquanto outros grupos podem ser taxonomicamente posicionados com pouca acurácia. Desta forma, o aumento no número de estudos sobre Bafes é necessário para expandir o conhecimento sobre esses organismos. As sequências depositadas em bancos de dados e a correlação com resultados de abordagem polifásica, fornecem dados que podem ser usados como referências para a identificação e classificação apropriadas de Bafes no futuro.



Phylogenetic diversity of aerobic spore-forming *Bacillales* isolated from Brazilian soils

J. C. Orem¹ · W. M. C. Silva^{1,2} · T. Raiol^{1,3} · M. I. Magalhães¹ · P. H. Martins¹ · D. A. Cavalcante¹ · R. H. Kruger¹ · M. M. Brigido¹ · M. T. De-Souza^{1,4} Received: 17 July 2018 / Revised: 20 March 2019 / Accepted: 15 April 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

The phylum *Firmicutes* comprises seven classes where most species are either aerobic or anaerobic endospore former. Inside *Firmicutes*, species allocated in the genus *Bacillus* and related genera are collectively named aerobic endospore-forming bacteria (AEFB), and the soil is their major reservoir. AEFB have great importance in health, agriculture, and biotechnology although the more studied species are *Bacillus subtilis* and the human pathogens *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. AEFB have great importance in health, agriculture, and biotechnology; although the knowledge about these organisms is based on few species, notably, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus anthracis*. In this work, we generated partial 16S rRNA gene sequences of both strands of 192 AEFB strains isolated from soils of *Distrito Federal*, Brazil (SDF strains). The resulting consensus sequences were used to obtain taxonomic assignment and establish the phylogenetic relationships among these strains. Through this approach, we could observe that classified SDF strains were distributed among genera *Bacillus* (169 strains; 88.02%), *Paenibacillus* (11; 5.73%), *Lysinibacillus* (6; 3.13%), *Brevibacillus* (4; 2.08%), *Terribacillus* (1; 0.52%), and *Rummeliibacillus* (1; 0.52%). Phylogenetic trees revealed these 192 SDF strains can be segregated into eight groups spanning families *Bacillaceae* and *Paenibacillaceae* belonging to the order *Bacillales*. To expand the knowledge about the diversity of these SDF strains, further studies regarding characterization with different methodologies are underway.

Keywords *Firmicutes* · *Bacillus* and related genera · Sporulation · Taxonomy · 16S rRNA gene

Introduction

The phylum *Firmicutes* comprises seven classes—*Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Limnochordia*, *Negativicutes*, *Thermolitobacteria*, and *Tissierellia*—where most species are both aerobic or anaerobic spore-formers, according to the list

of prokaryotic names with standing in nomenclature—LPSN (retrieved December 20, 2018, from www.bacterio.net). The typical thick Gram-positive cell wall is a major characteristic, although some can stain Gram-variable and few members belonging to class *Negativicutes* results in Gram-negative staining (Jumas-Bilak et al. 2004). Presently, *Firmicutes* allocates a core of related organisms termed the low G + C content group (Fritze 2004; De Vos et al. 2009; Galperin 2013; Seong et al. 2018). As stated by LPSN, 489 genera distributed in 46 families are considered within the phylum *Firmicutes* (retrieved December 20, 2018, from www.bacterio.net). Species allocated in the genus *Bacillus* (class *Bacilli*, order *Bacillales*, family *Bacillaceae*) and related genera, from the same or different families, are collectively named aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) (Fritze 2004; Galperin 2013).

AEFB are widespread in nature, and it is believed that soil is their major reservoir (Bai et al. 2002; Hong et al. 2009; Galperin 2013). The ability to grow in a wide temperature range, metabolic diversity, and the extreme spore resistance

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10123-019-00080-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. T. De-Souza
marlts@unb.br

¹ Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

² Federal Institute of Goias, Formosa, Brazil

³ Fiocruz Brasilia, Oswaldo Cruz Foundation, Brasilia, Brazil

⁴ IB/Departamento de Biologia Celular; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasilia, 70.910-900 Brasilia DF, Brazil

contribute to the ubiquity of this group of bacteria. Though some members such as *Bacillus anthracis* and *B. cereus* are notorious human pathogens (Jensen et al. 2003; Ehling-Schulz et al. 2005; Kolsto et al. 2009), thus having great importance in health issues, most of AEFB present recognizable potential in biotechnology (Jensen et al. 2003; Van der Auwera et al. 2007). In spite of the remarkable features of AEFB and their importance in basic research, most of the knowledge about these organisms is based on few species, notably, the model *B. subtilis*, *B. cereus*, and *B. anthracis* (Fritze 2004; Van der Auwera et al. 2007; Logan and De Vos 2011; Galperin 2013; Hutchison et al. 2014). Therefore, fundamental aspects of AEFB biology remain unknown for most members allocated in this genus and related ones, indicating the importance of increasing the knowledge in this field to perform more accurate identification and classification of these group of bacteria.

Due to the advance in sequencing technologies, 16S rRNA gene data is increasing in a very high rate, therefore enhancing the knowledge in microbial ecology and the discovery of new phylogenetic groups (Baker et al. 2003; De Vos et al. 2009; Maughan and Van der Auwera 2011). Although the 16S rRNA gene sequences-based studies are widely spread, the methodology receives criticisms concerning the super estimation of employing a single molecule to establish the evolutionary history of the species (Ludwig 2007). Some bacterial genomes may contain 1 to 15 rRNA operons with sequences varying among them (Acinas et al. 2004). Furthermore, the presence of multiple copies within a genome and the resulting heterogeneity are limiting factors to use these rRNA genes for species identification, especially in closely related organisms (Dahllöf et al. 2000; De Vos et al. 2009; Rajendhran and Gunasekaran 2011). There is also a concern about the universal primer complementarities towards the 16S rRNA gene sequences found in all prokaryote existing in the databases (Baker et al. 2003; Frank et al. 2008).

Despite being target of criticisms regarding the use as a molecular marker, the 16S rRNA gene sequences are accepted as the gold standard in phylogenetic studies and evolutionary inferences, thus being the basis of taxon arrangements in the *Bergey's Manual of Systematics* (Tringe and Hugenholtz 2008; De Vos et al. 2009; Hakorvita et al. 2016). In the last decades, besides determining phylogenetic relationships among AEFB, 16S rRNA gene sequences are also playing an important role in revealing several new AEFB families and genera within the order *Bacillales*. Further analyses including additional markers and genome-wide comparisons confirmed the 16S rRNA-based phylogeny as a pillar of prokaryote taxonomy, at least, at genus level and taxa above (Tringe and Hugenholtz 2008; Hakorvita et al. 2016). Likewise, identification focused on 16 rRNA gene sequences may be potentially complemented by other genotypic and complementary phenotypic

characterizations, in polyphasic studies, allowing a more holistic view of prokaryotic diversity and ecology (Kampf and Glaeser 2012).

We previously isolated 312 AEFB strains from soil of *Distrito Federal*, Brazil (SDF strains). These environmental strains (SDF0001-SDF0312) are deposited at the *Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos* (CBafes, or AEFB Collection). The CBafes is hosted at the University of Brasilia and is being inspected in a polyphasic approach for taxonomic classification. In this work, we generated partial sequences of both strands of 16S rRNA gene of SDF strains to obtain consensus sequences as a means to identify and establish the phylogenetic relationships among 192 SDF strains, which revealed a diversity of species distributed among six genera allocated in two different families.

Experimental procedure

Soil sampling and isolation of SDF strains. Soil samples and SDF strains isolation were described in Cavalcante et al. (2019), excepted that SDF strains from SDF0115–0312 were isolated by heat-shocking soil samples at 65, 70 or 80 °C. The 192 SDF strains (Table 1) used in this work were randomly selected from SDF0001 to SDF0312 strains deposited at the CBafes (AEFB Collection), hosted at the University of Brasilia, Brazil. Soil location sampling was obtained with a GPS equipment (Garmin GPS III): strains from SDF0001–0029 were isolated from soil sample collected at latitude of –15.767232, and longitude of –47.865556; SDF0030–0154 at latitude of –15.767201, and longitude of –47.866404; and SDF0155–0312 at latitude of –15.765090, and longitude of –47.864345.

Ethics statement

Specific permissions, required for the collection of bacterial strains used in this study, were endorsed by the Federal Brazilian authority (CNPq; Authorization of Access and Sample of Genetic Patrimony n° 010439/2015-3). Sampling did not involve endangered or protected species.

DNA isolation and amplification

Bacterial cells were grown in LB medium supplemented with 20 mM L-threonine, at 28 °C and agitation (200 rpm) until reaching an A_{600} between 5 and 6 units. Total DNA was extracted and purified using the Wizard genomic kit (Promega) according to the manufacturer's protocol and stored in nuclease-free water at –20 °C. A MiniCycler heated lid thermocycler (MJ Research, Inc.) was used to amplify DNA: 25 µL reactions were prepared by adding 0.4 µmol of each primer [27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') and 1492R (5' GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3')] (Lane,

Table 1 Taxonomic assignment of SDF strains

Genus	Taxonomic division*	Species	SDF strain
<i>Bacillus</i>	B	<i>B. cereus sensu lato</i>	0006; 0022; 0030; 0032; 0053; 0061; 0089; 0119; 0155; 0159; 0161; 0178; 0184; 0186; 0194; 0199; 0206; 0219; 0226; 0229; 0235; 0237; 0249; 0250; 0257; 0276; 0278; 0283; 0286; 0288; 0294; 0295; 0299; 0300; 0301; 0303; 0304; 0305; 0310
	D	<i>B. circulans</i>	0007
	F	<i>B. clausii</i>	0010; 0018
	D	<i>B. kochii</i>	0297
	D	<i>B. megaterium group</i>	0029; 0047; 0049; 0050; 0051; 0054; 0055; 0057; 0064; 0065; 0069; 0074; 0076; 0078; 0082; 0086; 0094; 0095; 0096; 0097; 0099; 0118; 0176; 0228; 0233; 0246; 0277; 0298; 0309; 0311
	B	<i>B. oleronius</i>	0015
	A	<i>B. pumilus sensu lato</i>	0001; 0002; 04; 0011; 0013; 0017; 0026; 0027; 0034; 0035; 0036; 0043; 0044; 0046; 0052; 0060; 0070; 0071; 0079; 0084; 0087; 0091; 0092; 0093; 0098; 0102; 0103; 0104; 0105; 0106; 0112; 0115; 0117; 0120; 0121; 0122; 0123; 0125; 0126; 0127; 0129; 0130; 0131; 0132; 0134; 0135; 0136; 0137; 0138; 0141; 0142; 0143; 0145; 0146; 0147; 0148; 0149; 0151; 0152; 0156; 0157; 0163; 0173; 0177; 0179; 0187; 0190; 0196; 0198; 0201; 0204; 0205; 0230; 0231; 0281; 0292; 0312
	C	<i>B. simplex</i>	0009; 0016; 0068; 0075; 0144; 0236; 0308
	A	<i>B. subtilis sensu lato</i>	0003; 0110; 0150; 0279; 0280; 0282; 0285; 0287; 0302
	<i>Brevibacillus (Br)</i>	H	<i>Br. borstelensis</i>
		<i>Br. laterosporus</i>	0020; 0197; 0220
<i>Lysinibacillus</i>	E	<i>L. fusiformis</i>	0005; 0284
		<i>L. sphaericus</i>	0019; 0037; 0174
<i>Paenibacillus</i>	G	<i>L. xylanilyticus</i>	0063
		<i>P. alvei</i>	0008; 0028; 0080; 0133; 0164; 0213
		<i>P. chibensis</i>	0259
		<i>P. lautus</i>	0215; 0265
		<i>P. susongensis</i>	0162
<i>Rummeliibacillus</i>	E	<i>P. terrigena</i>	0240
<i>Terribacillus</i>	E	<i>R. pycnus</i>	0066
	D	<i>T. goriensis</i>	0191

*according to Fig. 2

1991; O'Sullivan et al. 1992 *apud* Hayashi et al. 2004); 1.5 U of Taq polymerase (Sigma); 0.15 mM of each dNTP, 3 mM MgCl₂, 1X-buffer, and 1:100 dilution of template DNA. All amplifications were hot started at 95 °C for 3 min, followed by 94 °C for 30 s; 52 °C for 30 s; 72 °C for 1.5 min, in 25 cycles, and final extension step at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Sequencing and taxonomic assignments

The 16S rRNA gene amplified fragments were bidirectionally sequenced, using primers 27F or 1492R, by Sanger method (the Genomic Centre of the Midwest Region of Brazil facility). Phred scores of ≥ 20 were used to assess the quality of sequences. Taxonomic assignments of the sequences were

performed using BLAST (NCBI 2016) and Classifier (Wang et al. 2007a).

Consensus sequences

Consensus sequences were created using BioEdit 7.2.6 software (Hall 1999). Both forward and reverse chromatograms of the sequenced 16S rRNA gene fragments were analyzed by Chromas software (Technelysium Pty Ltd) to determine best quality regions. Regions without sharp peaks, resulting from weak signals were discarded using editing sequence function, followed by alignment using ClustalW (Larkin et al. 2007). Inconsistencies in the alignment could be resolved by checking the quality of each nucleotide in the original chromatograms. After manual edition of incorrect base calls, a consensus sequence for each SDF strain was generated

employing BioEdit. The resulting consensus sequences had between 550 and 600 nucleotides and were deposited at NCBI with sequential accession numbers from MH356287 to MH356479 (Table S1).

Phylogenetic trees

Sequences alignment by ClustalW (Larkin et al. 2007) and the phylogenetic analyses were performed with Ugene 1.30.0 software (Okonechnikov et al. 2012). The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood (PhyML) method based on the General Time Reversible model (Nei and Kumar 2000). The number of substitutions categories rate was four. The reference sequences were obtained from Genbank (NCBI), and the *Clostridium clariflavum* DSM19732 was chosen as outgroup. The species are shown in Fig. 2. A bootstrap consensus tree based on 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed.

Results and discussion

In this work, 192 AEFB isolated from Brazilian soil (SDF strains) had the 16S rRNA gene amplified and bidirectionally sequenced by the Sanger method. The resulting 384 sequences with PHRED quality of ≥ 20 in at least 400 nucleotides, as well as the resulting 192 consensus sequences ranging from 550 to 600 nucleotides, were submitted to taxonomic assignment using BLAST (NCBI) and Classifier (Ribosomal Database Project). Most of the SDF strains (Fig. 1) were allocated to genus *Bacillus* (169 strains; 88.02%) followed by genera *Paenibacillus* (11; 5.73%), *Lysinibacillus* (6; 3.13%), *Brevibacillus* (4; 2.08%), *Terribacillus* (1; 0.52%), and *Rummeliibacillus* (1; 0.52%). Taxonomic assignment (Table 1) and the phylogenetic tree (Fig. 2) showed the diversity of groups among these strains.

Among the 169 strains allocated in the genus *Bacillus*, members of *B. pumilus* group were predominant (77 strains;

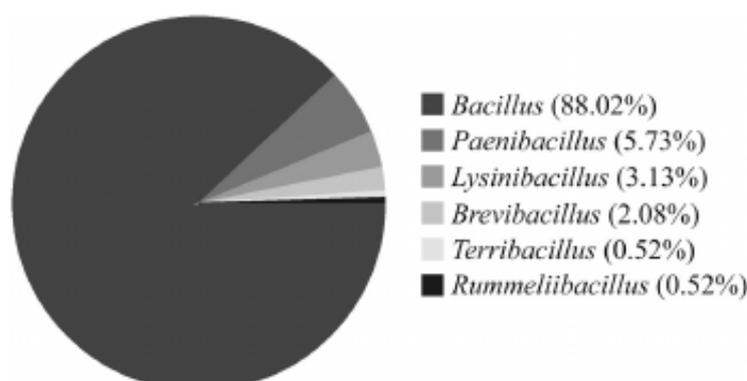
39.9%), followed by *B. cereus* group species (39; 20.20%), *B. megaterium* group (30; 15.54%), and *B. subtilis* group (9; 4.66%). It is noteworthy that *B. pumilus*, *B. cereus*, and *B. subtilis* groups are formed by extremely related members, making species delimitation very difficult when considering only the 16S rRNA gene analyses. Differently from the other *Bacillus* groups described above where there is a high identity in the genomes, *B. megaterium* and *B. aryabhata* share 99.7% of identity in the 16S rRNA gene sequences but their genomes are less than 70% identical. Therefore, the differentiation of these two strains using only this technique is very difficult (Shivaji et al. 2009). Besides the species belonging to the *Bacillus* groups mentioned above, the 16S rRNA gene sequence analyses indicate the presence of at least 17 different species belonging to 5 other genera (Table 1).

The phylogenetic tree shown in Fig. 2 is organized into eight major divisions, designated here as A, B, C, D, E, F, G, and H.

B. pumilus sensu lato (*sl*) and *B. subtilis sl* are represented in division A (Fig. 3). Both groups are composed of extremely related species and are also related to each other, as observed by the grouping in the phylogenetic tree (Fig. 2). *B. subtilis sl* comprises the species *B. subtilis sensu stricto* (*ss*), *B. amyloliquefaciens*, *B. tequilensis*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, and *B. vallismortis* (Wang et al. 2007b). The *B. pumilus* group was the most representative in the phylogenetic tree (Fig. 2) and is formed by *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis*, and *B. aerophilus* (Liu et al. 2013).

Division B (Fig. 4) is composed by *B. cereus sl* in which species are differentiated by plasmid contents since the respective genomes may share 99% identity (Fritze 2004; Guinebrière et al. 2008; Kolsto et al. 2009). Previously, transmission electron microscopy (TEM) images obtained in our laboratory (Cavalcante et al. 2014) also corroborate some strains clustering observed in this work, as is the case of strain SDF0030 in which is possible to see a parasporal crystal inside the sporangium. The presence of this crystal, the taxonomic assignment, and the clustering with other species of *B. cereus* group strongly suggests that this can be classified as a *B. thuringiensis* strain.

Fig. 1 Genera assignments of 192 SDF strains. The distribution of 192 SDF strains among six genera belonging to families Bacillaceae and Paenibacillaceae show a preponderance of *Bacillus* spp.



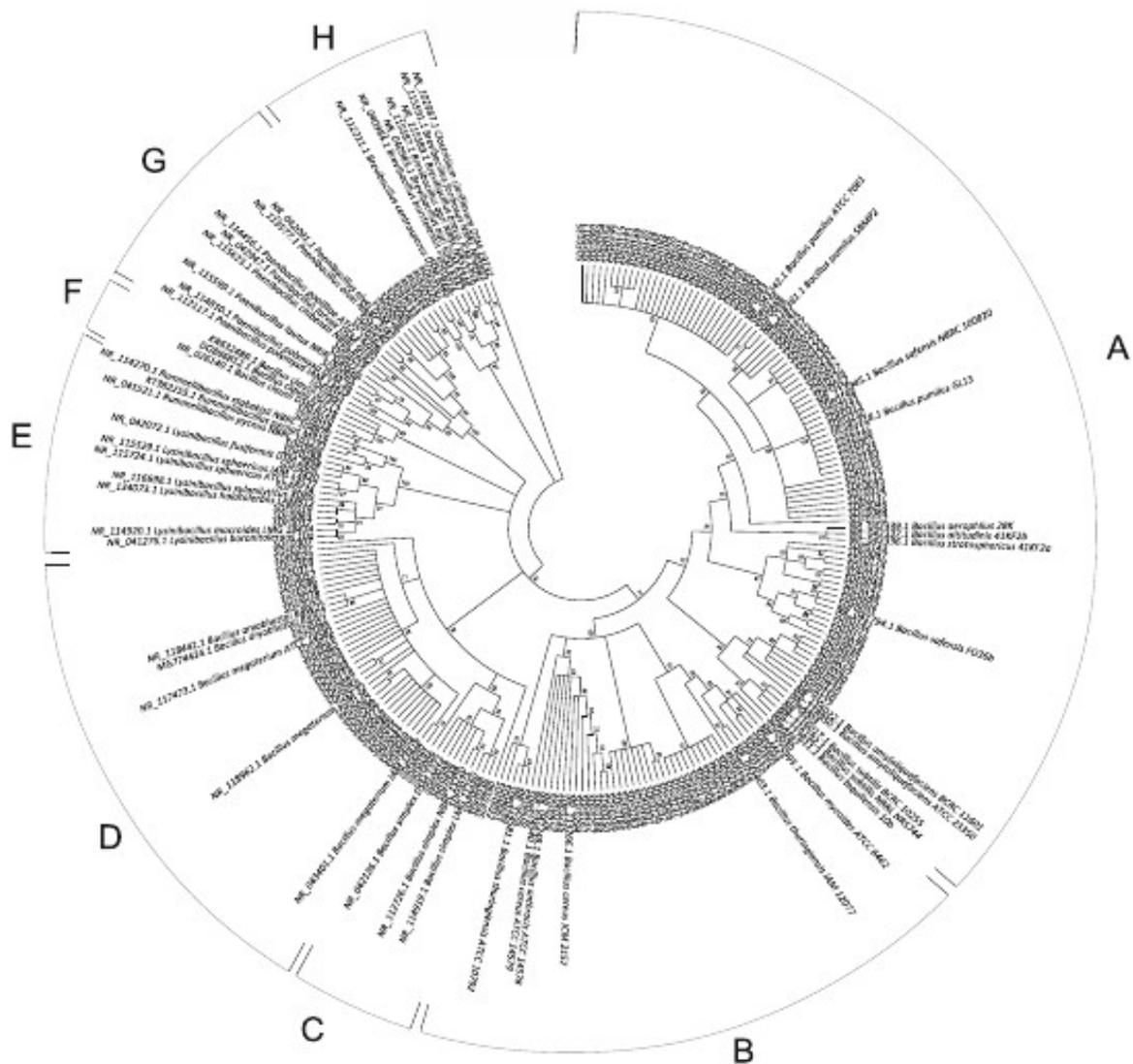


Fig. 2 Phylogenetic relationship among 192 SDF strains. The evolutionary history based on 16S rRNA sequences was inferred by Maximum likelihood with GTR method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history

of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. Numbers representing SDF strain designations and reference species are indicated in the branches

Division C comprises the species *B. simplex* (Fig. 5b), division D strains assigned as *B. megaterium* and *B. aryabhattachay* (Fig. 5a) and division E is composed by members belonging to the genera *Lysinibacillus* and *Rummeliibacillus*. The subtree showing *Lysinibacillus* spp. cluster (Fig. 5c) includes the strains SDF0005, SDF0019, SDF0037, and SDF0063. These strains present phenotypes (data not shown) that are compatible to those described to genus *Lysinibacillus* including a spherical endospore located in the terminal portion of a

swelling sporangium, often described to species belonging to this genus (De Vos et al. 2009).

The SDF strains identified as *B. clausii* (Table 1; SDF0010 and 0018) are allocated at division F (Fig. 2 and 5d). This division was expected to be more related to other *Bacillus* spp.; however, the phylogenetic tree (Fig. 2) showed that it was more related to other genera, including *Paenibacillus* spp., which is allocated outside family *Bacillaceae*. Considering the complexity in identifying *Bacillus* spp. many

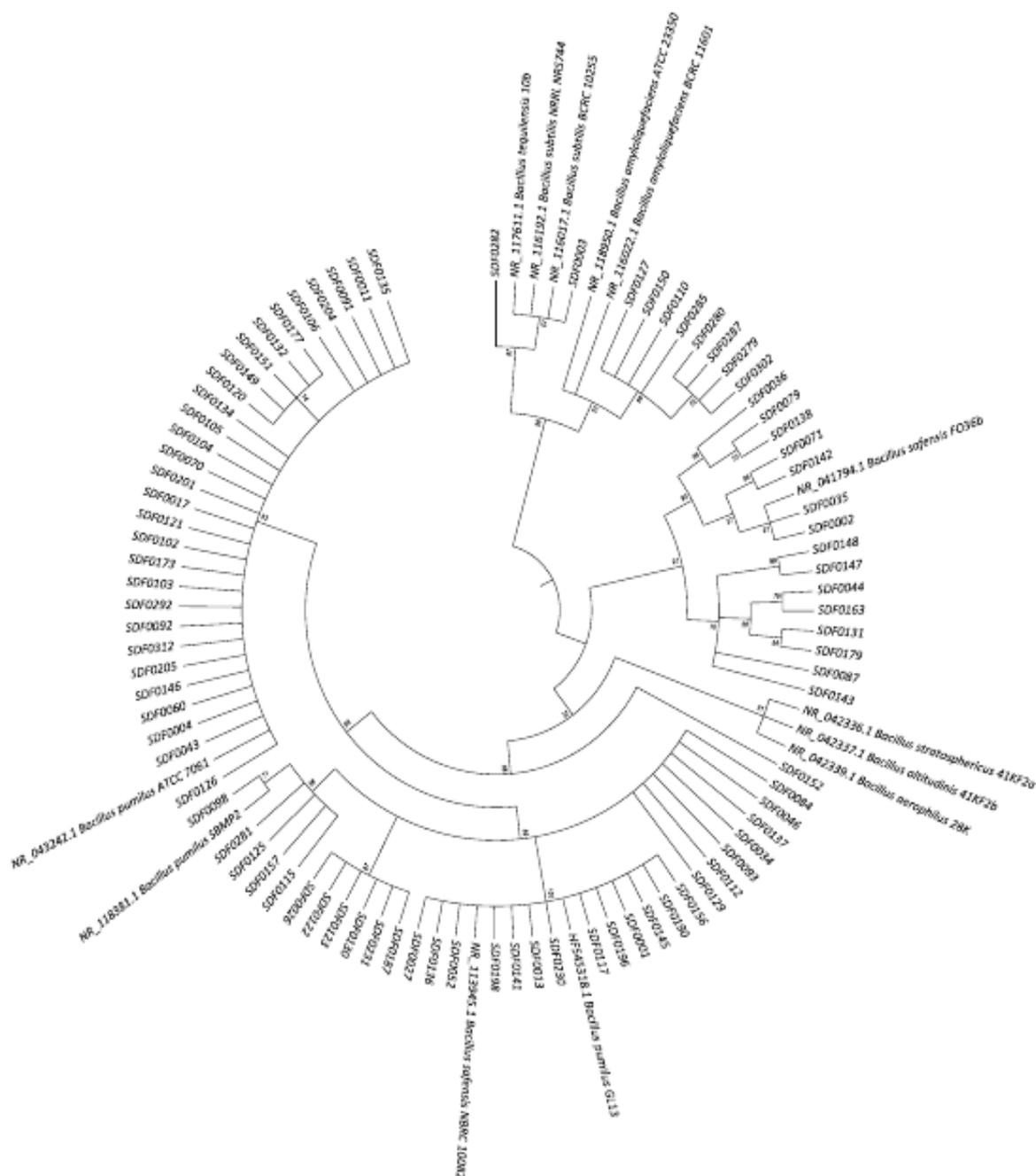


Fig. 3 Phylogenetic relationship of SDF strains belonging to *B. pumilus* and *B. subtilis* groups. *B. pumilus* and *B. subtilis* groups comprise closely related species which are difficult to differentiate by 16S rRNA gene

sequence analyses. Both groups are also related to each other. Numbers representing SDF strain designations and inferred are indicated in the branches. Tools used for phylogenetic inference are described in Fig. 2

strains may be misassigned to this genus (De Vos et al. 2009). *B. clausii* could be one of these species, since it is not phylogenetically related to the type species *B. subtilis*, according to *Bergey's Manual of Systematics—Firmicutes*.

Divisions G (Fig. 6b) and H (Fig. 6a) are composed by species assigned to genera *Paenibacillus* and *Brevibacillus*, respectively. Although both genera belong to family *Paenibacillaceae*, the clustering in the phylogenetic tree was

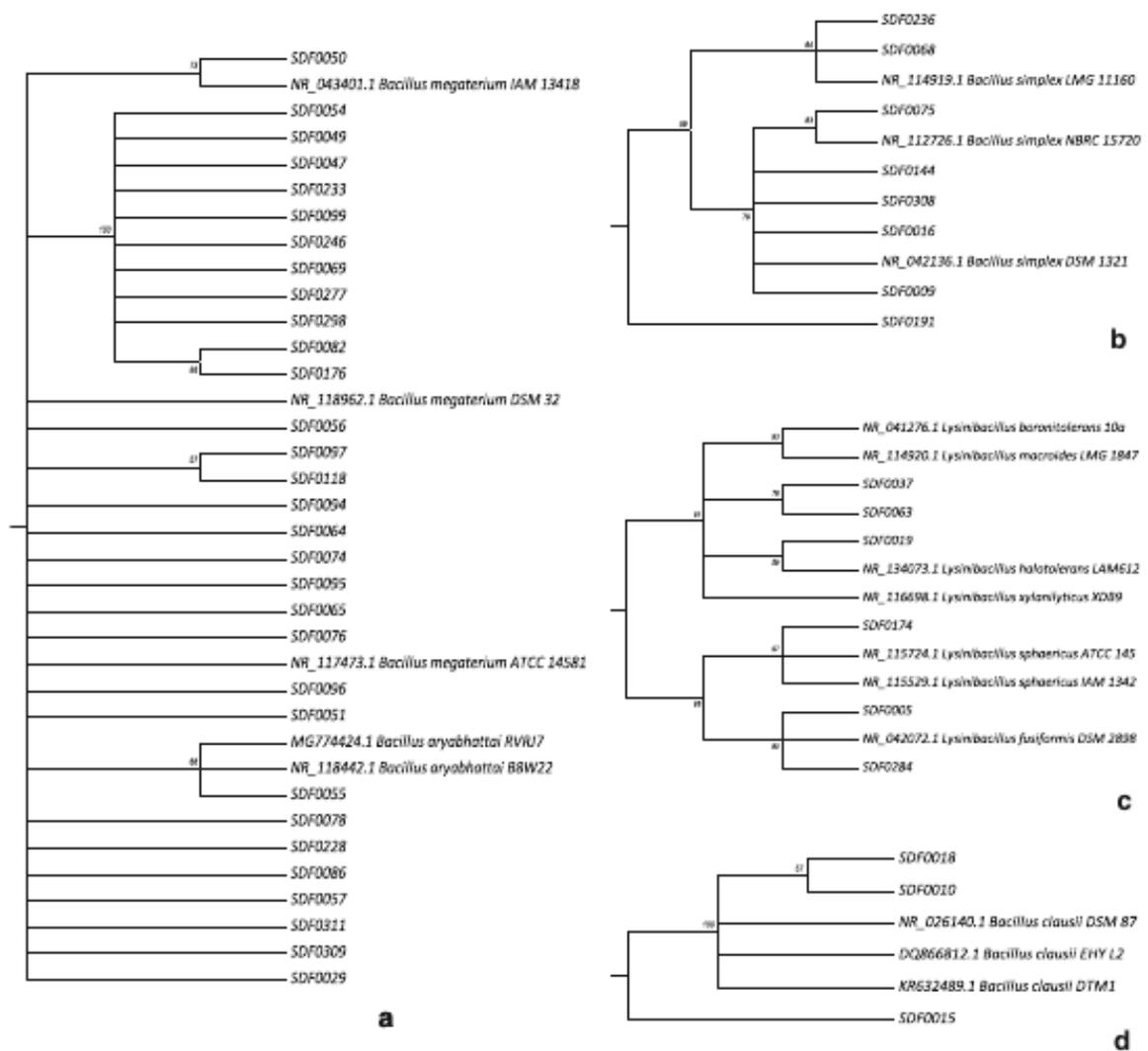


Fig. 5 Subtree of SDF strains assigned to genera belonging to family *Bacillaceae*. SDF strains assigned to *B. megaterium* group (**a**); *B. simplex* (**b**); *Lysinibacillus* spp. (**c**); and *B. clausii* (**d**). Numbers

representing SDF strain designations and inferred species, as assigned by phylogeny based on 16S rRNA gene sequences, are indicated in the branches. Tools used for phylogenetic inference are described in Fig. 2

microbial species became available, therefore, the diversity of certain bacterial groups is underestimated (Bai et al. 2002; Fierer 2017). In some cases, the loss of sequences can reach 10% (Seong et al. 2018). When this is the chosen approach, members of the phylum *Firmicutes* are the most abundant, but this scenario changes when culture-independent methods are employed (Janssen 2006; Zhang and Xu 2008; Filippidou et al. 2015). The bulk of clone libraries built from 16S rRNA gene sequences amplified from soil samples show a stable community structure belonging to nine phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, and

Gammatimonadetes (Janssen 2006; Zhang and Xu 2008; Youssef and Elshahed 2009). Members of the phylum *Firmicutes* present low abundance in diversity studies, being about 2% of the library compositions (Janssen 2006). It is possible that the low abundance observed in culture-independent studies is due to the difficulty in lysing vegetative cells and especially spores. Therefore, in this condition, the DNA of *Firmicutes* members would be unavailable to 16S rRNA gene sequence amplification.

In 2009, Youssef and Elshahed analyzed the abundance and diversity within the most representative phylum of five libraries. In agreement with other studies, the authors

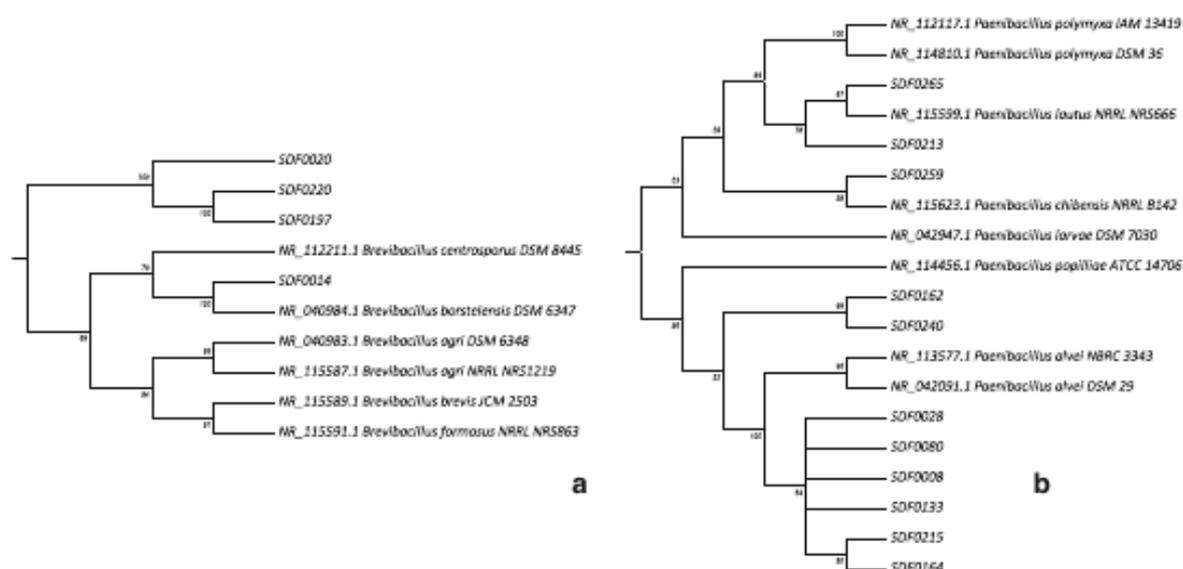


Fig. 6 Subtree of SDF strains assigned to family *Paenibacillaceae*. SDF strains assigned to *Brevibacillus* spp. (a) and *Paenibacillus* spp. (b). Numbers representing SDF strain designations and inferred species as

assigned by phylogeny based on 16S rRNA gene sequences are indicated in the branches. Tools used for phylogenetic inference are described in Fig. 2

observed a low abundance of phylum *Firmicutes* species, even though representing the most diverse phylum. After this result, these authors postulated that as each individual species uses different resources and occupies distinct niches in the community, the most diverse communities present a greater contribution to the ecosystem (Loreau and Hector 2001; Bell et al. 2005). This idea could be extrapolated to the strains with the highest diversity, as the member of phylum *Firmicutes*.

A relatively low number of bacterial phyla comprise the majority of 16S rRNA sequences in diversity assessment (Fierer 2017). The most studied groups are likely to have more taxa (e.g., *Bacillus*), while the remaining, or new, groups may be positioned with a lack of accuracy (Parks et al. 2018). Therefore, an increment in the number of studies regarding AEFB is needed to expand the knowledge about these organisms. The ever-increasing number of sequences deposited in databases and the correlation with results of polyphasic approach will provide more data to be used as references to the appropriate identification and classification of AEFB in the future.

Acknowledgments We thank the University of Brasilia and the Brazilian research funding agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrm operons. *J Bacteriol* 186(9):2629–2635
- Bai Y, D'Aoust F, Smith DL, Driscoll BT (2002) Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can J Microbiol* 48(3):230–238
- Baker CG, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55:541–555
- Bell T, Newman J, Silveira B, Turner S, Lilley A (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436:1157–1160
- Cavalcante DA, Orem JC, De-Souza MT (2014) Diversity of bacterial spores from Brazilian Cerrado soil strains by transmission electron microscopy. In: International multidisciplinary microscopy congress, springer proceedings in physics, vol 154. ISBN 978-3-319-04638-9. Springer International Publishing, Switzerland, pp 227–231
- Cavalcante DA, De-Souza MT, Orem JC, Magalhães MIA, Martins PH, Boone TJ, Castillo JA, Driks A (2019) Ultrastructural analysis of spores from diverse *Bacillales* species isolated from Brazilian soil. *Environ Microbiol Rep* 11(2):155–164
- Dahlöf I, Baillie H, Kjellerberg S (2000) *spoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecific heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3376–3380
- de Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA (2009) In: Schleifer K-H, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 3: the Firmicutes, Second edn, New York
- Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretière M-H et al (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiol* 151:183–197
- Fierer N (2017) Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* 15:579–590
- Filippidou S, Junier T, Wunderlin T, Chien-Chi L, Po-E L, Chain P, Junier P (2015) Under-detection of endospore-forming *Firmicutes* in metagenomic data. *Comput Struct Biotechnol J* 13:299–306

- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaun JS, Wilson BA, Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 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
- Galperin MY (2013) Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*. *Microbiol Spectr* 1(2):1–15
- Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-Schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, de Vos P (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ Microbiol* 10(4):851–865
- Hakorvita JR, Prezioso S, Hodge D, Pillai SP, Weigel LM (2016) Identification and analysis of informative single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA gene sequences of the *Bacillus cereus* group. *J Clin Microbiol* 54:2749–2756
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y (2004) Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in healthy subjects. *Microbiol Immunol* 48(1):1–6
- Hong HA, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM (2009) Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res Microbiol* 160:375–379
- Hutchison EA, Miller DA, Angert ER (2014) Sporulation in bacteria: beyond the standard model. *Microbiol Spectr* 2(5): TBS-0013-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Janssen P (2006) Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72(3): 1719–1728
- Jensen GB, Hansen BM, Eillenbergh J, Mahillon J (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* 5(8): 631–640
- Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H et al (2004) *Veillonella montpellierensis* sp. nov., a novel, anaerobic, gram-negative coccus isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1311–1316
- Kämpfer P, Glaeser SP (2012) Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol* 14(2): 291–317
- Kolsto AB, Tourasse NJ, Okstad OA (2009) What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Ann Rev Microbiol* 63:451–476
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp 115–175
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947–2948
- Liu Y, Lai Q, Dong C, Sun F, Wang L, Li G, Shao Z (2013) Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS One* 8(11): e80097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Logan NA, de Vos P (eds) (2011) *Endospore-forming soil bacteria*, 1st edn. Springer, New York
- Loreau M, Hector A (2001) Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412:72–76
- Ludwig W (2007) Nucleic acid techniques in bacterial systematic and identification. *Int J Food Microbiol* 120(3):225–236
- Maughan H, Van der Auwera G (2011) *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol* 11:789–797
- NCBI Resource Coordinators (2016) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 44:D7–D19
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, p 333
- O'Sullivan MG, Thornton GC, O'Sullivan GC, Collins JK (1992) Probiotic bacteria myth or reality? *Trends Food Sci Technol* 31:309–314
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28(8): 1166–1167
- Parks DH, Chuvpochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewsky A, Chaumeil P-A, Hugenholtz P (2018) A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life bacterial taxonomy. *Nat Biotechnol* 36:996–1004
- Rajendhran J, Gunasekaran P (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166:99–110
- Seong CN, Kang JW, Lee JH, Seo SY, Woo JJ, Park C, Bae KS, Kim MS (2018) Taxonomic hierarchy of the phylum *Firmicutes* and novel *Firmicutes* species originated from various environments in Korea. *J Microbiol* 56(1):1–10
- Shivaji S, Chaturvedi P, Begum Z, Pindi PK, Manorama R, Padmanaban DA, Shouche YS, Pawar S, Vaishampayan P, Dutt CBS, Datta GN, Manchanda RK, Rao UR, Bhargava PM, Narlikar JV (2009) *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus irviniensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 12):2977–2986. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002527-0>
- Tringe SG, Hugenholtz P (2008) A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 11(5):442–446
- Van der Auwera G, Timmerly S, Hoton F, Mahillon J (2007) Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in food-stuffs. *Int J Food Microbiol* 113:164–172
- Wang L-T, Lee FL, Tai CJ, Kasai H (2007a) Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 8): 1846–1850
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007b) Naïve Bayesian classifier for rapid aof rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* (16):5261–5267
- Youssef N, Elshahed M (2009) Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *ISME J* 3(3):305–313
- Zhang L, Xu Z (2008) Assessing bacterial diversity in soil. *J Soils Sediments* 8(6):379–388

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

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.
- 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.
- Baltrus, D.A. **Exploring the costs of horizontal gene transfer.** Trends in Ecology and Evolution, 28(8): 489-495.
- Baràk, 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.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T.G., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J. 2002. **Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** Applied and Environmental Microbiology, 68(10): 5082-5095.
- 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.
- Brillard, J.; Jéhanno, I.; Dargaignaratz, C.; Barbosa, I.; Ginies, C.; Carlin, F.; Fedhila, S.; Nguyen-the, C.; Broussole, V.; Sanchis, V. 2010. **Identification of *Bacillus cereus* genes specifically expressed during growth at low temperatures.** Applied and Environmental Microbiology, 76(8): 2562-2573.
- 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.
- Cavalcante, D.A. 2014. **Ultraestrutura e Termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- Cavalcante D.A., Orem J.C., De-Souza M.T. (2014) **Diversity of Bacterial Spores from Brazilian Cerrado's Soil Strains by Transmission Electron Microscopy.** In: Polychroniadis E., Oral A., Ozer M. (eds) International Multidisciplinary Microscopy Congress. Springer Proceedings in Physics, vol 154. Springer, Cham
- Cary, S.G.; Fierer, N. 2014. **the importance of sample archiving in microbial ecology.** Nature Reviews Microbiology, 12, 789-790.
- Chassy, B.M. 1976. **A gentle method for the lysis of oral streptococci.** Biochemical and biophysical research communications, 68(2): 603-608.
- 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, L.C.; 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.; Rurner, 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.
- Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Guinebrière, M.-H.; et al. 2005. **Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains.** Microbiology, 151: 183-197.
- 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.
- Eriksson, S.; Hurme, R.; Rhen, M. 2002. **Low-temperature sensors in bacteria.** Philosophical Transactions of the Royal Society, 357: 887-893.
- Fonseca, R.R.; Albrechtsen, A.; Themudo, G.E.; et al. 2016. **Next-generation biology: Sequencing and data analysis**

- approaches for non-model organisms.** *Marine Genomics*, 30: 3-13.
- Fritze, D. 2004. **Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria.** *Phytopatology* 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.
- Gardener, B.B.M. 2004. **Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.** In *Agricultural Systems*. *Phytopatology*, 94(11). 1252-1258.
- Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Lilburn, T.G. 2005. **Taxonomic outline of the prokaryotes.** In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*,
- Giovannoni, S. 2004. **Oceans of bacteria.** *Nature*, 430: 515-516.
- Graum, P.; Schröder, K.; Schmid, R.; Marahiel, M.A. 1996. **Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*.** *Journal of Bacteriology*, 178(15): 4611-4619.
- 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.
- Guarilia-Oropeza, V.; Helmann, J.D. 2011. ***Bacillus subtilis* $\sigma(V)$ confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan O-acetylation and D-alanylation of teichoic acids.** *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/JB.06023-11.
- 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, Buysse, 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*.
- Guinebretière, M-H, Fabiano L. Thompson, Alexei Sorokin, Philippe Normand,5 Peter Dawyndt, Monika Ehling-Schulz, Birgitta Svensson, Vincent Sanchis, Christophe Nguyen-The, Marc Heyndrickx and Paul De Vos. 2008. **Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group.** *Environmental Microbiology*, 10(4):851–865.
- Haldenwang, W.G. 1995. **The Sigma Factors of *Bacillus subtilis*.** *Microbiological Reviews*, 59(1): 1-30.
- Hall, T. (1999) **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser*: 95-98.
- Hayashi, H.; Sakamoto, M; Benno, Y. (2004) **Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in healthy subjects.** *Microbiol Immunol*, 48(1): 1–6.
- Heather, J.M.; Chain, B. 2015. **The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA.** *Genomics*, 107(1): 1-8.
- 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.
- Hu, X.; Mahillon, J. 2004. **Life Cycle and Gene Exchange.** Em: *Endospore-Forming Soil Bacteria*. Springer, 1^a. Ed.
- Hutchison, E.A.; Miller, D.A.; Angert, E.R. 2014. **Sporulation in Bacteria: beyond the standard model.** *Microbiological spectrum*, 2(5).
- 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.
- Jones, P.G.; Inouye, M. 1994. **The cold-shock response – a hot topic.** *Molecular Microbiology*, 11(5). 811-818.
- 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.
- Kämpfer, P.; Glaeser, S.P. (2012) **Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited.** *Environ Microbiol*, 14(2): 291-317.
- 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.
- Kolsto, A.-B., Tourasse, N.J., Okstad, O.A. 2009. **What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?** *Annual reviews microbiology*, 63: 451-476.
- Konstantin Okonechnikov, Olga Golosova, Mikhail Fursov, and UGENE team. (2012) **Unipro ugene: a unified bioinformatics toolkit.** *Bioinformatics*, 28(8):1166–1167.
- Koonin, E.V.; Galperin, M.Y. 2003. **Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics.** Kluwer Academic Press.
- Koren, S.; Phillippy, A.M. 2015. **One chromosome, one contig: complete microbial genomes from long-read sequencing and assembly.** *Current Opinion in Microbiology*, 23: 110-120.
- 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 odyseyi* sp. nov., a round-spore-forming bacillus isolated from the Mars Odyssey spacecraft.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 195-201.
- Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.M. 2015. **Insect pathogens as biological control agents: back to the future.** *Journal of invertebrate pathology*, Epub 27 jul 2015.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, Wiley, New York. p.115–175.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; et al. (2007) **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Lawson, P.A.; Citron, D.M.; Tyrell, K.L.; Finegold, S.M. 2016. **Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938.** *Anaerobes*, 40: 95-99.
- 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.
- List of prokaryotic names with standing in nomenclature.** Disponível em www.bacterionet.com. Acesso em março/2016.
- Liu, Y.; Lai, Q.; Dong, C.; Sun, F.; Wang, L.; Li, G.; Shao, Z. (2013) **Phylogenetic Diversity of the *Bacillus pumilus* Group and the Marine Ecotype Revealed by Multilocus Sequence Analysis.** *Plos One*, 8(11).
- 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, 1ª. 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, 1ª. 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, 1ª. Ed.
- Mandic-Mulec, I.; Stefanic, P.; van Elsas, J.D. 2015 **Ecology of Bacillaceae.** *Microbiology Spectrum*, 3(1).
- Martins, P.H.; Cavalcante, D.A.; Bezerra, F.P.; Orem, J.C.; De-Souza, M.T. 2015. **Caracterização fenotípica da Coleção de bactérias aeróbias formadoras de endósporos da Universidade de Brasília.** 10º Simpósio de Recursos genéticos para a América Latina e Caribe, Bento Gonçalves, Brasil.
- 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.
- Mazzon, R.R.; Lang, E.A.S.; Silva, C.A.P.T.; Marques, M.V. 2012. **Cold shock genes *cspA* and *cspB* from *Caulobacter crescentus* are post-transcriptionally regulated and important for cold adaptation.** *Journal of Bacteriology*, 194: 6507-6517.
- 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.
- 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.
- Needleman SB, Wunsch CD. 1970. **A general method applicable to the search for similarities in the amino acid**

- sequence of two proteins.** J. Mol. Biol.;48:443–453.
- Ohba, M., Mizuki, E., Uemori, A. 2009. **Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*.** Anticancer Research, 29: 427-434.
- Orem, J.C. 2014. **Filogenia e perfil plasmidial de bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas do solo do Distrito Federal.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
- Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD. 2001. **Underpinning the future of life sciences and technology.** Report.
- O’Sullivan, M.G.; Thornton, G.C.; O’Sullivan, G.C.; Collins, J.K. (1992) **Probiotic bacteria myth or reality?** Trends Food Sci. Technol, 31: 309–314.
- Pace, N.R.; Sappb, J.; Goldenfeldc, N. 2012. **Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life.** Proc Natl Acad Sci USA, 109 (4): 1011-1018.
- 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.
- Parente, Ana Flávia ; Silva-Pereira, Ildinete ; Baldani, José Ivo ; Tibúrcio, Victor Hugo da Silva ; Báó, Sônia Nair ; DE-SOUZA, Marlene Teixeira . **Construction of *Bacillus thuringiensis* wild-type S76 and Cry- derivatives expressing a green fluorescent protein: two potential marker organisms to study bacteria-plant interactions.** Canadian Journal of Microbiology (Online), v. 54, p. 786-790, 2008.
- Phelps, R.J.; McKillip, J.L. 2002. **Entorotoxin 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.
- 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.
- 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.
- Portin, P. 2015. **A comparison of biological and cultural evolution.** Journal of Genetics, 94(1): 155-168.
- Praszkier, J., Pittard, A.J. 2005. **Control of replication in I-complex plasmids.** Plasmid, 53: 97-112.
- Prüss, B.M.; Francis, K.P.; von Stetten, F.; Scherer, S. 1999. **Correlation of 16S ribosomal DNA signature sequences with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group.** Journal of Bacteriology, 181(8). 2624-2630.
- Raiol, T.; De-Souza, M.T.; Oliveira, J.V.A.; Silva, H.S.L.L.; Orem, J.C.; Cavalcante, D.A.; Almeida, N.F.; Telles, G.P.; Setubal, J.C.; Brígido, M.M.; Torres, F.A.; Stadler, P.S.; Walter, M.E.; Moraes, L.M. 2014. **Draft Genome Sequence of FT9, a Novel *Bacillus cereus* Strain Isolated from a Brazilian Thermal Spring.** Genome announcements, 2(5).
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. 2011. **Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond.** Microbiological Research, 166: 99-110.
- Ramamurthi, K.S.; Losick, R. 2008. **Grasping at origins.** Cell, 134(6): 916-918.
- 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.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Okstad, O.A., et. al. 2007. **Complete sequence analysis of novel**
- 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.
- Ricker, N.; Qian, H.; Fulthorpe, R.R. 2012. **The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution.** Genomics, 100(3): 167-75.
- 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.
- 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.
- Shivaji, S.; Chaturvedi, P.; Begum, Z.; et al. (2009) ***Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere.** Int J Syst Evol Microbiol: 2977-2986.
- 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.
- Sinotti, M.C. ; de Castro, L.L. Dias ; Leite, F.L.L ; Gallina, T. ; De-Souza, M.T. ; Santos, D.F.L. ; Leite, F.P.L. . **Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep.** Journal of Helminthology, v. Firstv, p. 1-6, 2014.
- Skinner. M.K. **Environmental Epigenetics and a Unified Theory of the Molecular Aspects of Evolution: A Neo-Lamarckian Concept that Facilitates Neo-Darwinian Evolution.** Genome, Biology and Evolution, 7(5): 1296-1302.
- Smith TF, Waterman MS. **Identification of common molecular subsequences.** J. Mol. Biol. 1981;147:195–197.

- Souza, M.A.L. 2010. **Alinhamento Múltiplo Progressivo de Proteínas**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP.
- Stanfors, L.P.; Granum, P.E. 2001. **Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis***. FEMS Microbiology Letters, **197**: 223-228.
- 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.
- 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.
- Tringe, S. G.; Hugenholtz, P. 2008. **A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene**. Curr Opin Microbiol, **11**(5): 442-446.
- Van Bolgelen, R.A.; Neidhart, F.C. 1990. **Ribosomes as sensors of heat and shock in *Escherichia coli***. Proceedings of the National Academy of Science, **87**: 5589-5593.
- 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., 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.
- Van der Auwera, G.; Mahillon, J. 2008. **Transcriptional analysis of the conjugative plasmid pAW63 from *Bacillus thuringiensis***. Plasmid, **60**: 190-199.
- Van Gestel, N.C.; Reischke, S.; Baath, E. 2013. **Temperature sensitivity of bacterial growth in a hot desert soil with large temperature fluctuations**. Soil Biology and biochemistry, **65**: 180-185.
- Verbaendert, I.; de Vos, P. 2011. **Studying Denitrification by Aerobic Endospore-forming Bacteria in Soil**. Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria**. Springer, 1ª. 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. 1987. **Bacterial Evolution**. Microbial and Molecular Biology Reviews, **51**(2): 221-271.
- Woese, C.R. 2000. **Interpreting the universal phylogenetic tree**. PNAS, **97**(15): 8392-8396.
- Woese, C.R; Foz, G.E. 1977. **Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms**. PNAS, **74**(11): 5088-5090.
- Xiong, J. 2006. **Essential Bioinformatics**. Cambridge University Press, Nova Iorque.
- 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.