

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FELIPPE BUCK CAMPANA

**Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na
produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção
quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes**

Piracicaba

2012

FELIPPE BUCK CAMPANA

Biólogo

Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Orientadora: Dra. Danielle Gregório Gomes Caldas.

Piracicaba

2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Campana, Felipe Buck

Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes / Felipe Buck Campana; orientadora Danielle Gregório Gomes Caldas. - - Piracicaba, 2012.

170 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias lácticas 2. Biofilmes 3. Fermentação alcoólica 4. Polimorfismo
5. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 662.754:579.864

Dedico...

*...aos meus pais Enio e Oreni pela formação do meu caráter, educação e
personalidade,
às minhas irmãs Samara e Simone pelo companheirismo,
aos meus queridos sobrinhos Gabriel e Guilherme por tantos momentos de
alegria já proporcionados
e à minha avó Orélia pelas rezas, amor e carinho.*

Agradeço...

...primeiramente a Deus.

...à minha amada família pela paciência e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e por terem acreditado no meu potencial para chegar aonde cheguei. Prometo sempre lhes dar muito orgulho! Amo vocês!

...à Dra. Danielle Gregório Gomes Caldas pela orientação, conselhos e pela troca de conhecimentos fundamentais para minha evolução profissional.

...à Profa. Dra. Tsai Siu Mui por me acolher em seu laboratório e possibilitar o desenvolvimento da minha pesquisa, investindo e contribuindo com tanto empenho para o sucesso de seus alunos.

...à empresa Fermentec S/C – Consultoria em Fermentação Alcoólica e aos seus representantes Dr. Henrique Vianna de Amorim, Dr. Mário Lúcio Lopes, Marcel Lorenzi e Marcos Oliveira pela parceria neste projeto, pelas informações dadas e pelo fornecimento de amostras.

...ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

...ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por me acolher já há tantos anos e possibilitar meu desenvolvimento como cientista e também aos seus docentes e funcionários Alzira, Sônia, Neuda, Fábio, Daiane e Cláudia, entre outros, pelo suporte.

...aos queridos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular Aline França, Ana Beraldo, Andressa, Carol, Enéas, Fabi, Felipe Jóia, Fernanda Cassieri, Fernanda Nakamura, Gustavo, João, Maju, Milena, Rafael, Raquel e Janne e aos que já passaram pelo CENA, Aline Borges, Aline Morgan, Bianca Furlan, Ézio, Lilian, Lina, Mariana Redondo, Mariana Germano, entre outros. Em especial aos tão queridos Naissa, Marília, Caio e Marcela pela amizade e por tanta ajuda oferecida e galhos quebrados, à Marina, minha companheira de

projeto, pelos altos papos sobre nossos resultados, ao Acácio pelos sábios conselhos e dicas,
ao Lucas por ter me cedido a “vaga” no cantinho da salinha, à Helena pela bela amizade
conquistada e amparo recíproco, à Bia Ferrari pela serenidade, ao Clóvis pela atenção e ao
Dennis pela camaradagem.

...aos técnicos do laboratório José Elias Gomes, Fábio Duarte, Chiquinho (*in memoriam*) e
Wagner Picinini pelo apoio.

...à querida Lud pela alegria contagiante, prestatividade, prontidão em ajudar no que for
preciso e pela amizade.

...à bibliotecária Adriana Moretti pelo auxílio na adequação do trabalho de acordo com as
normas.

...a todos os meus amigos queridos, pelos conselhos, companhia e pela paciência e
compreensão pela minha ausência nos momentos finais da minha pesquisa.

...a todas as pessoas especiais que de alguma maneira me incentivaram, torceram por mim e
estiveram sempre ao meu lado seja qual fosse a ocasião...

...MUITO obrigado!!!

“

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein | 1879 - 1955

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	19
LISTA DE TABELAS.....	23
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 Biofilmes.....	33
2.2 Contaminantes da fermentação alcoólica.....	35
2.3 <i>Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)</i>	41
2.4 PCR quantitativo.....	44
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Coleta de amostras.....	49
4.2 Extração de DNA.....	50
4.3 Análises de T-RFLP.....	52
4.3.1 Análise de sequências <i>in silico</i> para definição de uso das enzimas de restrição.....	52
4.3.2 Amplificação do 16S rRNA ribossomal.....	53
4.3.3 Purificação dos produtos de PCR.....	53
4.3.4 Reação de restrição dos produtos de PCR para análise de T-RFLP.....	54
4.3.5 Análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i>	54
4.3.6 Processamento dos dados para geração de índice de diversidade e análise multivariada (PCA).....	55

4.3.7 Comparação dos resultados T-RFLP com banco de dados e inferência filogenética.....	56
4.3.8 Avaliação de capacidade quantitativa da técnica de T-RFLP.....	57
4.4 Desenvolvimento e testes de <i>primers</i> para utilização em qPCR.....	58
4.4.1 Desenho, análise e seleção dos <i>primers</i>	58
4.4.2 Obtenção de isolados bacterianos para teste dos <i>primers</i>	58
4.4.3 Extração de DNA de isolados.....	59
4.4.4 Ajustes para amplificação em reação de PCR para checagem dos <i>primers</i>	60
4.4.5 Construção de biblioteca com fragmentos amplificados pelos <i>primers</i>	61
4.4.6 Clonagem dos produtos de PCR.....	62
4.4.7 Produção de células competentes.....	62
4.4.8 Transformação bacteriana.....	63
4.4.9 Lise de células bacterianas em TE.....	63
4.4.10 PCR de inserto e purificação.....	64
4.4.11 PCR de sequenciamento e precipitação.....	65
4.4.12 Análise das sequências.....	65
4.5 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR).....	66
4.5.1 Pré-amplificação das amostras.....	66
4.5.2 PCR quantitativo para o gene 16S rRNA universal de <i>Bacteria</i>	67
4.5.3 PCR quantitativo para o gene 16S rRNA táxon-específico.....	67
4.5.4 Relação com Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 Coleta de amostras e extração de DNA.....	69
5.2 Análises de T-RFLP.....	69
5.2.1 Análise de sequências <i>in silico</i> para definição de uso das enzimas de restrição.....	69
5.2.2 Índice de diversidade e análise multivariada (PCA).....	71
5.2.3 Identificação dos contaminantes.....	79

5.2.4 Avaliação de capacidade quantitativa da técnica de T-RFLP.....	99
5.3 Desenvolvimento e testes de <i>primers</i> para utilização em qPCR.....	103
5.3.1 Desenho, análise e seleção dos <i>primers</i>	103
5.3.2 Isolados bacterianos utilizados para teste dos <i>primers</i>	107
5.3.3 Amplificação em PCR para checagem dos <i>primers</i> desenhados.....	108
5.3.4 Identificação de fragmentos de 16S rRNA gerados por <i>primers</i> do gênero <i>Halomonas</i> em amostra de biofilme de dorna (BD).....	117
5.4 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR).....	122
6. CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS.....	133
APÊNDICE.....	147

RESUMO

CAMPANA, F.B. **Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes.** 2012. 170 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A contaminação bacteriana por espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* entre outras bactérias lácticas é um dos principais fatores que afetam o rendimento da fermentação alcoólica. A formação de biofilmes acaba protegendo as bactérias e é uma fonte permanente de contaminação. Objetivando caracterizar tais contaminações em (1) biofilmes de centrífuga, dorna, trocador de calor e tubulação de água e (2) melão, mosto, levedo, levedo tratado (com H₂SO₄) e vinho, amostras foram coletadas em diferentes períodos de um sistema fermentativo de alto teor alcoólico (16%). As enzimas de restrição *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* e *MspI* utilizadas nas análises de T-RFLP foram definidas por análises *in silico* com sequências do gene 16S rRNA de contaminantes frequentes. Essas enzimas geram uma maior quantidade de T-RFs únicos entre 30 e 650 pb. Os DNAs extraídos das amostras foram submetidos às análises de T-RFLP para obtenção do perfil molecular das comunidades microbianas dos pontos de coleta. Os índices de diversidade de *Shannon* foram calculados com base no número dos T-RFs. Foram realizadas as análises dos componentes principais (PCA) e a inferência filogenética dos contaminantes com base nos perfis dos T-RFs. A quantificação dos principais táxons contaminantes foi feita por qPCR utilizando *primers* específicos delineados neste estudo e considerando a média de cópias do gene 16S rRNA presentes no genoma de cada táxon bacteriano. Na primeira coleta o biofilme de água apresentou maior índice de diversidade microbiana e na segunda, melão e mosto. PCA sugere que os biofilmes (e não as fontes externas) são os principais contaminantes desse processo fermentativo devido as suas semelhanças com a composição das outras comunidades analisadas. Espécies de *Lactobacillus* e *Bacillus* predominaram entre as amostras da primeira coleta. *Halomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Pseudomonas* foram detectados em amostras de biofilme e em amostras líquidas, sendo os principais contaminantes provindos de biofilme no momento da primeira coleta. Na segunda coleta *Bacillus* foi o principal contaminante e novamente gêneros produtores de ácido láctico como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* foram os mais frequentes. Os resultados concordam com o reportado na literatura sobre sistemas fermentativos convencionais. Apenas os *primers* desenhados para amplificação do gene 16S rRNA de *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Weissella* apresentaram especificidade em testes com isolados. *Halomonas* sp. foi encontrada em biofilme de dorna através do sequenciamento utilizando *primers* para esse gênero. *Halomonas* pode produzir levânio podendo haver o consumo da sacarose disponível para fermentação. Biofilme da centrífuga teve a maior quantidade de micro-organismos nos dois momentos de coleta (1,93E+06 UFC.mg⁻¹ e 2,14E+07 UFC.mg⁻¹, respectivamente) assim como as amostra de levedo entre as amostras líquidas (1,03E+08 UFC.ml⁻¹ e 2,96E+06 UFC.ml⁻¹, na primeira e segunda coleta, respectivamente), indicando níveis consideráveis de contaminantes. *Burkholderia* e *Pseudomonas* foram os mais abundantes entre as amostras de biofilmes da primeira e segunda coleta. Nas amostras líquidas *Burkholderia* apresentou-se em maior quantidade na maioria das amostras da primeira coleta; enquanto *Pseudomonas* e *Weissella* em geral predominaram equivalentemente entre as amostras da segunda coleta.

Palavras-chave: contaminantes bacterianos, fermentação alcoólica, biofilme, diversidade, T-RFLP, *primers*, qPCR.

ABSTRACT

CAMPANA, F.B. **Temporal and spatial monitoring of bacterial contamination in bioethanol production: a molecular characterization by T-RFLP and quantitative detection by qPCR of community-formers biofilms.** 2012. 170 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Bacterial contamination by *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Leuconostoc* and other lactic acid bacteria is one of the main factors that affects the yield in alcoholic fermentation process. Biofilm formation protects the bacteria community and it is a permanent source of contamination. For characterization of these contaminations in (1) biofilms from centrifuge, tank fermentation, heat exchanger and water pipe and (2) molasses, must, yeast, yeast treated (with H₂SO₄) and wine, samples were taken at two different periods from fermentation system characterized by high alcohol yields (16%). Restriction enzymes *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* and *MspI* used in T-RFLP analysis were defined by 16S rRNA gene sequences analysis *in silico* from common contaminants. These enzymes generate high number of unique T-RFs between 30 and 650 bp. DNA from samples were used as template in T-RFLP reactions in order to obtain molecular profiles of microbial communities present at each sample. *Shannon* diversity index was calculated based on T-RFs numbers. Principal component analysis (PCA) and phylogenetic inference of contaminants were performed based on T-RFs profiles. The main contaminant bacterial taxa were quantified by qPCR using specific primers designed in this study and considering the average of 16S rRNA gene copies previously counted into the genome of each bacterial taxon. Water pipe biofilm showed the highest rate of bacterial diversity in the samples collected in the first sampling period. For the samples collected in the second sampling, the highest rate of bacterial diversity was revealed for molasses and must. PCA suggested that biofilms (but not external sources) are the main contaminants in the studied fermentation process. It is probably due their similarities with the composition of other analyzed communities. *Lactobacillus* and *Bacillus* species predominated in first sampling period. *Halomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Pseudomonas* were detected in biofilm and liquid samples. They were the main contaminants from biofilm at this time of sampling. In the second sampling period, *Bacillus* was the most common genera and other lactic acid bacteria such *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus* were also the most frequent contaminants. These results agree with other reported in the literature about conventional fermentation systems. Only the primers designed in this study to amplify the 16S rRNA gene of *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Weissella* showed specificity in tests with bacterial strains. *Halomonas* sp. was revealed in biofilms from tank fermentation by DNA sequencing using designed primers for genera. *Halomonas* can produce levan and may consume sucrose available for generation of alcohol. Centrifugal biofilm had the highest amount of bacteria in both sampling periods (1.93E+06 CFU.mg⁻¹ and 2.14E+07 CFU.mg⁻¹, respectively). In liquid samples, yeast had the highest amount of bacteria in both sampling periods (1.03E+08 CFU.ml⁻¹ and 2.96E+06 CFU.ml⁻¹, respectively); it shows significant levels of contaminants. *Burkholderia* and *Pseudomonas* were more abundant among biofilm samples of all samplings. *Burkholderia* was present in high quantities in the majority of liquid samples taken during the first sampling period; *Pseudomonas* and *Weissella* equivalently predominated among samples taken during the second sampling period.

Keywords: bacterial contaminants, alcoholic fermentation, biofilm, diversity, T-RFLP, primers, qPCR.

LISTA DE ILUTRAÇÕES

- Figura 1 – 1) O DNA é extraído da amostra de interesse; 2) O gene de interesse é amplificado usando a técnica de PCR com um *primer* marcado com fluorescência; 3) Produtos de PCR de tamanho igual ou similar marcados com fluorescência na extremidade final. Após a purificação, os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição, que geram fragmentos de diferentes tamanhos. 4) Estes fragmentos são separados em gel de eletroforese ou capilaridade. 5) Um leitor a laser detecta os fragmentos marcados e gera um perfil baseado no comprimento dos fragmentos. Fonte: GRUNTZIG et al., (2002).....43
- Figura 2 – Sistema simplificado do processo Mellet-Boinot de produção de bioetanol (modificado de Amorim et al. (2011)).....50
- Figura 3 – Simulação explicando o funcionamento da análise filogenética dos resultados do T-RFLP. As espécies bacterianas A, B, C e D compõem uma amostra analisada. Após a PCR, com *primers* para o gene 16S rRNA, são gerados fragmentos de DNA de mesmo tamanho para todas as amostras. O corte com a enzima X gera dois tamanhos de T-RFs diferentes, 50 pares de bases para as espécies A e B, e 100 pares de bases para C e D. Logo, A e B não podem ser distinguidas através da análise com a enzima X, o mesmo ocorre com C e D. A análise com a enzima Y produz novamente apenas dois tamanhos de fragmentos diferentes, 200 pb para A e D, e 150 pb para B e C. Logo, somente com os resultados dessa enzima, não podemos distinguir A de D, e nem B de C. Porém, ao cruzarmos os dados das análises das duas enzimas, vemos que cada espécie apresenta uma combinação única de fragmentos nas análises com as duas enzimas, podendo ser distinguidas através desses resultados. Se a tabela ilustrada fosse nosso banco de dados, poderíamos perguntar a ele, qual espécie corresponde a um fragmento de 50 pb para a enzima X e a um fragmento de 200 pb para a enzima Y. E teríamos como única resposta: a espécie A.....57
- Figura 4 – Representação gráfica dos índices de diversidade de *Shannon* encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da primeira coleta. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação. Valores nas colunas seguidos de diferentes

letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \leq 0,05$).....73

Figura 5 – Representação gráfica dos índices de diversidade de *Shannon* encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da segunda coleta. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \leq 0,01$).....74

Figura 6 – Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras industriais da primeira coleta determinadas por T-RFLP com as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* e *MspI*. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.....76

Figura 7 – Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras industriais da segunda coleta determinadas por T-RFLP com as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* e *MspI*. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.....77

Figura 8 – Número total de gêneros e espécies identificados pela concatenação dos resultados das seis enzimas utilizadas no T-RFLP em amostras da primeira e segunda coleta. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.....80

Figura 9 – Eletroferogramas gerados pelos T-RFLPs dos isolados 1 e 2 utilizando 25 ng, 50 ng, 100 ng, 125 ng e 150 ng de fragmento do gene 16S rRNA purificado para digestão com as enzimas de restrição *AluI* (A) e *HaeIII* (B).....100

Figura 10 – Eletroferogramas gerados pelos T-RFLPs das amostras industriais 1 e 2 utilizando 25 ng, 50 ng, 100 ng, 125 ng e 150 ng de fragmento do gene 16S rRNA purificado para digestão com as enzimas de restrição *AluI* (A) e *HaeIII* (B).....102

Figura 11 – Árvore filogenética simplificada baseada em classificação taxonômica pelo gene 16S rRNA destacando apenas os gêneros de interesse. O comprimento dos ramos

não representa qualquer relação evolutiva entre os táxons.....116

- Figura 12 – Gel de agarose de amplificação de região do gene 16S rRNA de amostras de BD e VINHO com *primers* 341-357f/Hlm-604-R (fragmento esperado: 272 pb) utilizando diferentes temperaturas de anelamento (TA) (67°C e 69°C) e concentração final de MgCl₂ 1,5 mM (A) e com *primers* 341-357f/Hlm-446-R (fragmento esperado 114 pb) utilizando temperatura de anelamento 66°C (B) e concentração final de MgCl₂ 2,5 mM. PM: padrão molecular 100 pb *DNA Ladder* (Life Technologies). CN: controle negativo.....118
- Figura 13 – Curvas de *melting* das amplificações do gene 16S rRNA de *Bacteria* e dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Weissella* nas amostras coletadas.....124
- Figura 14 – Estimativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC.mg⁻¹) de bactérias dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras de biofilme da primeira e segunda coleta. Nas barras dos gráficos está representado o erro padrão das réplicas técnicas.....127
- Figura 15 – Estimativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC.ml⁻¹) de bactérias dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras líquidas da primeira e segunda coleta. Nas barras dos gráficos está representado o erro padrão das réplicas técnicas.....128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de espécies fornecedoras de sequências do gene 16S rRNA utilizadas em simulação <i>in silico</i>	52
Tabela 2 – <i>Primers</i> 16S rRNA universais de <i>Bacteria</i> utilizados juntamente com os <i>primers</i> delineados neste trabalho.....	60
Tabela 3 – Avaliação das enzimas de restrição analisadas nos experimentos <i>in silico</i>	70
Tabela 4 – Valores do índice de diversidade de <i>Shannon</i> encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da primeira coleta.....	72
Tabela 5 – Valores do índice de diversidade de <i>Shannon</i> encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da segunda coleta.....	72
Tabela 6 – Principais gêneros e espécies identificados por análises de T-RFLP de amostras da primeira coleta.....	82
Tabela 7 – Resumo dos principais gêneros encontrados nas amostras da primeira coleta classificados pela frequência de aparecimento das espécies relacionadas.....	85
Tabela 8 – Principais gêneros e espécies identificados por análises de T-RFLP de amostras da segunda coleta.....	91
Tabela 9 – Resumo dos principais gêneros encontrados nas amostras da segunda coleta classificados pela frequência de aparecimento das espécies relacionadas.....	97
Tabela 10 – <i>Primers</i> gênero-específicos desenhados e suas características principais.....	105
Tabela 11 – Relação de espécies fornecedoras de material genético utilizado para teste com os <i>primers</i> desenhados.....	107
Tabela 12 – Ocorrência de ampliações através de testes de PCR com <i>primers</i> gênero-específicos e DNA de isolados representantes de cada gênero.....	110
Tabela 13 – Condições determinadas experimentalmente para reações de PCR com os <i>primers</i> com especificidade comprovada pelos testes.....	114

Tabela 14 – Análise por <i>SeqMatch</i> do RDP de sequências obtidas dos clones contendo fragmento do gene 16S rRNA amplificado com <i>primer</i> específico desenhado para o gênero <i>Halomonas</i>	119
Tabela 15 – Características das curvas padrões desenvolvidas para quantificação de cópias do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> e dos gêneros específicos.....	123
Tabela 16 – Valores de temperatura de <i>melting</i> da curva padrão e das amostras obtidos pela análise da curva de <i>melting</i> das reações de qPCR com <i>primers</i> específicos para cada táxon alvo.....	125
Tabela 17 – Abundância do número total de cópias do gene 16S rRNA (cópias.mg ⁻¹) dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras de biofilme da primeira e segunda coleta.....	127
Tabela 18 – Abundância do número total de cópias do gene 16S rRNA (cópias.ml ⁻¹) dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras líquidas da primeira e segunda coleta.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
2BCEN	Amostra de biofilme do prato de centrífuga da segunda coleta
2BD	Amostra de biofilme de dorna de fermentação da segunda coleta
2BH2O	Amostra de biofilme de tubulação de água da segunda coleta
2BT	Amostra de biofilme do trocador de calor da segunda coleta
2MEL	Amostra de melação da segunda coleta
2MST	Amostra de mosto da segunda coleta
2PC	Amostra de levedo (pé-de-cuba) da segunda coleta
2PCT	Amostra de levedo (pé-de-cuba) tratado com H ₂ SO ₄ da segunda coleta
2VINHO	Amostra de vinho de levedurado da segunda coleta
ANOVA	Análise de variância
BCEN	Amostra de biofilme do prato de centrífuga da primeira coleta
BD	Amostra de biofilme de dorna de fermentação da primeira coleta
BH2O	Amostra de biofilme de tubulação de água da primeira coleta
BSA	Albumina Sérica Bovina
BT	Amostra de biofilme do trocador de calor da primeira coleta
CIA	Clorofórmio Álcool-Isoamílico
CLSM	Microscopia Confocal por Varredura a Laser
CN	Controle Negativo
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
D.O.	Densidade Ótica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo Trifosfato
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetracético
FAM	6-carboxifluoresceína
g	Força centrífuga relativa
kg	Quilograma
LAB	Bactéria produtora de ácido láctico

LB	Meio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
m/v	massa/volume
MEL	Amostra de melação da primeira coleta
mg	Miligrama
MiCA	<i>Microbial Community Analysis</i>
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MST	Amostra de mosto da primeira coleta
NC-IUB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry</i>
ng	Nanograma
nm	Nanomolar
P	Probabilidade
p/v	parte/volume
pb	Par de bases
PC	Amostra de levedo (pé-de-cuba) da primeira coleta
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Padrão Molecular
pmol	Picomol
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	PCR quantitativo em tempo-real
RDP	<i>Ribosomal Data Base Project</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossômico
<i>rrnDB</i>	<i>Ribosomal RNA Operon Copy Number Database</i>
S	Coeficiente de sedimentação
TA	Temperatura de Anelamento
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TE	Tris-EDTA
TM	Temperatura de <i>melting</i>
ton	Tonelada
T-RF	<i>Terminal-Restriction Fragment</i> (Fragmento de Restrição Terminal)
T-RFLP	<i>Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volt
v/v	volume/volume
VINHO	Amostra de vinho delevedurado da primeira coleta
X-Gal	5-bromo-4cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosídeo

1. INTRODUÇÃO

A indústria sucroalcooleira do Brasil vem tomando importância cada vez maior nos últimos anos. A procura por fontes renováveis de energia e o estímulo à produção de bicompostíveis vêm aumentando a demanda dos mercados nacional e internacional por etanol. Para atender essa crescente demanda novas unidades produtivas estão em construção e já existem trabalhos para aumentar sua eficiência e capacidade produtiva.

Na safra 2011/12, as destilarias brasileiras produziram cerca de 23 bilhões de litros de etanol. O processo de produção de bioetanol no Brasil utiliza a cana-de-açúcar como matéria prima e é caracterizado pela fermentação industrial em grandes dornas (0,5 a 3 milhões de litros) e pelo uso de altas densidades de células de leveduras (10 – 15% m/v). Aproximadamente 85% das destilarias funcionam por batelada-alimentada e apenas 15% funcionam com o processo fermentativo contínuo.

A fermentação ocorre num período de 6 – 12 horas a partir da utilização de mosto preparado com caldo de cana-de-açúcar ou melaço diluído com água ou ainda pela mistura de ambos. No final do processo a concentração do álcool pode atingir 7 – 11% (v/v) e o açúcar residual remanescente no vinho permanece em menos de 0,1%. Então o mosto fermentado é centrifugado para separação do levedo do vinho. O vinho é encaminhado para a destilação enquanto que o levedo concentrado recebe um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0 – 2,5) visando diminuir a contaminação bacteriana. Depois de 2 – 3 horas as células de levedura retornam aos tanques de fermentação para reiniciar um novo ciclo. Essas são as características do processo Melle-Boinot de fermentação. Esse processo é realizado de 200 a 300 dias e depende de vários fatores como região de plantio, condições climáticas, variedade de cana utilizada e demandas de mercado. As células de levedura são recicladas de 400 a 600 vezes durante o período de safra que ocorre de Abril a Novembro ou de Setembro a Março no Centro-Sul ou no Nordeste do Brasil, respectivamente (AMORIM et al., 2011).

Um novo sistema de fermentação vem sendo desenvolvido objetivando atingir níveis de concentração final de álcool de até 16%, produzindo também menos resíduo final (vinhaça). São produzidos 7 litros a menos de vinhaça por litro de etanol em comparação com o processo que gera 8% de teor alcoólico. Para isso estão sendo selecionadas cepas de leveduras adequadas que suportem o reciclo nessas condições. O processo é realizado em

temperaturas mais baixas. O tempo de fermentação não se altera muito e permanece em 17 horas (ao contrário das 70 horas necessárias para fermentação de alto teor alcoólico a partir do milho). Espera-se que a contaminação bacteriana presente num processo de alto teor alcoólico seja menor que a do processo usual.

A contaminação bacteriana é considerada um dos principais fatores que afetam o rendimento da fermentação alcoólica. Entre as bactérias contaminantes encontradas com maior frequência no caldo de cana-de-açúcar e na fermentação alcoólica encontram-se as espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; GALLO, 1992). Lushia e Heist (2005) e Heist (2009) apontam as bactérias gram-positivas ácido lácticas e outros gêneros como *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Acetobacter* e membros da família *Enterobacteriaceae* também como frequentes contaminantes no processo de produção de bioetanol.

As bactérias competem com as leveduras pelas fontes de açúcar, produzindo ácidos orgânicos, gomas e outros metabólitos. Além disso, contaminações elevadas acabam induzindo a floculação das leveduras como descrito para o *Lactobacillus fermentum* (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). Quando isso ocorre, a indústria sofre perdas significativas no rendimento fermentativo além de consumir mais antibiótico e ácido sulfúrico na tentativa de controlar a contaminação bacteriana. Estima-se que as destilarias brasileiras gastam por ano cerca de 120 a 150 milhões de reais com antibióticos, ácido e outros biocidas para controlar a contaminação bacteriana.

É importante para indústria também ter conhecimento da quantidade dos micro-organismos contaminantes presentes em cada ponto do sistema para que os devidos procedimentos sejam realizados para combatê-los a tempo, evitando problemas mais sérios. Quando a contaminação atinge 10^8 células por mililitro de amostra podem ocorrer perdas de 10 a 30 mil litros de bioetanol por dia para uma destilaria que produz 1 milhão de litros diariamente (AMORIM et al., 2011).

Tem sido bem estabelecido na literatura que a formação de biofilmes acaba protegendo as bactérias e ao mesmo tempo servindo como uma fonte permanente de contaminação bacteriana. O esqueleto de exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias habitantes do biofilme as confere proteção contra agentes nocivos químicos e físicos. Entretanto, faltam informações sobre as comunidades bacterianas presentes nos biofilmes formados em processos industriais de produção de bioetanol, seja nas extensas tubulações que

transportam o caldo de cana, águas, mosto e levedo, ou nas próprias dornas de fermentação, serpentinas e trocadores de calor. Além disso, faltam informações sobre a contribuição destas espécies presentes nos biofilmes para a contaminação das fermentações alcoólicas e tolerância aos antibióticos usados pela indústria.

Ferramentas moleculares baseadas na extração direta do DNA total de biofilmes, seguida da análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) tem permitido obter uma visão mais completa sobre a estrutura e composição das comunidades de bactérias presentes em diversos ambientes. É uma técnica que possibilita a estimativa da diversidade de comunidades microbianas sem os vieses impostos pelos métodos de isolamento e cultivo e sem o oneroso trabalho necessário para a construção de bibliotecas de clones de 16S rRNA (FISHER; TRIPLET, 1999). O PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) por sua vez é uma ferramenta molecular que pode fornecer rapidamente informações quantitativas.

A proposta desta pesquisa foi avaliar se os biofilmes são as principais fontes reintegradoras de contaminantes para o sistema de produção de bioetanol, também em processos de alto teor alcoólico.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, em parceria com a empresa Fermentec S/C – Consultoria em Fermentação Alcoólica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biofilmes

Biofilme pode ser definido como uma comunidade de células bacterianas estruturadas, enclausuradas em uma matriz polimérica auto-produzida (formada por exopolissacarídeos) e aderidas a uma superfície inerte ou viva (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Praticamente qualquer tipo de superfície (animal, mineral ou vegetal) pode servir de ancoradouro para colonização bacteriana (DUNNE, 2002). A presença da matriz é importante tanto para a formação da estrutura como para a proteção das células (CARVAHO, 2007).

Na maioria dos habitats naturais, associações com a superfície de uma estrutura conhecida como biofilme é a forma prevalecente da vida microbiana. A associação com a superfície é um meio eficiente de conseguir condições favoráveis de microambiente ao invés de ser levado pela corrente. A vida planctônica ou fase de livre-nadante da bactéria pode ser vista primariamente como uma forma de se mover de uma superfície para a outra (WATNICK; KOLTER, 2000). As bactérias tendem a manter um estilo de vida baseado em comunidades ligadas a uma superfície (DUNNE, 2002).

A inclinação das bactérias se tornarem ligadas a superfícies é tão onipresente em diversos ecossistemas que sugere uma forte vantagem seletiva e de sobrevivência para as moradoras da superfície sobre suas semelhantes de vida-livre. Uma explicação óbvia para a adesão das bactérias seria que os nutrientes em um meio aquoso tendem a se concentrar próximo a superfícies sólidas. Outra dica que reforça a importância da adesão microbiana é a evolução de estruturas especializadas e complexas interações de ligação em procariotos desenhados especificamente para o reconhecimento de superfícies e formação do biofilme (DUNNE, 2002).

A formação de biofilmes é mediada por numerosos processos mecânicos, bioquímicos e genéticos (SAWHNEY; BERRY, 2009). Estudos genéticos de biofilmes de espécies únicas têm demonstrado que eles se formam em múltiplas etapas, requerem sinalização intercelular e demonstram um perfil de transcrição gênica diferente das células planctônicas (WATNICK; KOLTER, 2000). A formação dos biofilmes também tem sido atribuída ao sistema de

quorum-sensing. Este é um sistema de comunicação entre células e permite a bactéria reagir a mudanças ambientais para promover sua sobrevivência e prosperação (SHAWHNEY; BERRY, 2009)

A adesão das bactérias às superfícies depende de fatores tais quais: atração promovida por forças de *van der Waals*, movimento browniano, forças gravitacionais, cargas eletrostáticas e interações hidrofóbicas (GOTTENBOS; BUSSCHER; MEI, 2002). Na formação do biofilme, primeiro a bactéria se aproxima da superfície de forma tão estreita que sua mobilidade é reduzida, podendo formar uma associação transiente com a superfície ou com outra bactéria já fixada. Essa associação transiente permite à bactéria procurar melhor por um lugar para se fixar. Uma vez que ela tenha encontrado, formará uma associação estável como membro de uma micro colônia. Finalmente, a estrutura tridimensional do biofilme é erguida. Linhagens bacterianas que não são capazes de produzir exopolissacarídeos apresentam menor habilidade de aderência (CARVALHO, 2007). No entanto a presença de uma espécie de micro-organismo numa superfície formando biofilme promove um ambiente propício (fértil) para que ocorra adesão de outras espécies (DUNNE, 2002). Ocasionalmente, bactérias associadas ao biofilme podem sair do mesmo para procurar habitats mais favoráveis, mostrando que o biofilme não é um agregado estático de células (DUNNE, 2002; WATNICK; KOLTER, 2000).

Muitas bactérias respondem ao tratamento com antibiótico através do aumento na síntese de polissacarídeos ou pela formação de biofilmes (O'TOOLE; STEWART, 2005). O exopolissacarídeo produzido pode promover proteção contra agentes antimicrobianos e xenobióticos e à radiação UV, alterações no pH, choque osmótico e dessecação (CARVALHO, 2007). Células associadas a um biofilme costumam, portanto, ser mais resistentes a muitas substâncias e fatores ambientais do que células planctônicas.

Stewart (2002) e Watnick e Kolter (2000) atribuem a maior resistência a antibióticos dos micro-organismos presentes em biofilmes devido à redução na capacidade de penetração das substâncias, baixa difusão e taxa de crescimento (fatores como disponibilidade de oxigênio e pH podem afetar essa condição), respostas adaptativas ao estresse, formação de células persistentes e efeitos específicos de *quorum-sensing*. Pode também ocorrer a transferência horizontal de genes entre linhagens resistentes e não resistentes (CARVALHO, 2007).

Diversos esforços são realizados para promoverem o extermínio dessas estruturas. A adição de compostos orgânicos e inorgânicos em revestimentos superficiais assim como o uso de metais específicos (cobre, por exemplo) podem inativar ou matar micro-organismos aderidos ou prevenir sua adesão (CARVALHO, 2007). O mesmo autor também cita outros métodos eficientes que destroem essas estruturas, entre eles métodos mecânicos (raspamento, sonicação, congelamento, uso de altas temperaturas), químicos (biocidas, detergentes e surfactantes) e enzimáticos (para decomposição da matriz exopolimérica). O uso desses métodos em conjunto pode ser mais eficaz.

Agregados de células tais quais os biofilmes podem constituir um problema sério para vários processos industriais. Eles podem causar corrosão e limitar a locomoção de substâncias e troca de calor em canos, tubulações e aparelhagens servindo como fonte constante de infecções microbianas (CARVALHO, 2007). Portanto estudos sobre biofilmes são necessários e importantes para conhecer sua composição e seu funcionamento em diversos ambientes. Uma grande quantidade de técnicas vem sendo utilizadas para o estudo de biofilmes, tais quais: microscopia de campo brilhante, microscopia de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal por varredura a laser (CLSM), além dos métodos moleculares (SAWHNEY; BERRY, 2009). Um entendimento da genética e da bioquímica das complexas interações entre espécies no biofilme é crítico para nossa compreensão de como essa estrutura funciona e sobrevive. Vários problemas causados por biofilmes na indústria são relatados na literatura, porém não existem informações sobre a composição da comunidade bacteriana de biofilmes encontrados em destilarias no Brasil.

2.2 Contaminantes da fermentação alcoólica

Durante a fermentação alcoólica, etapa do processo de produção de álcool etílico, as leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol e gás carbônico. Nesta fase podem ocorrer vários problemas entre os principais merece destaque a contaminação bacteriana. Devido à temperatura, acidez, concentração de açúcares e de nutrientes, entre outros fatores que ocorrem durante a fermentação alcoólica, há o desenvolvimento de muitos microrganismos como bactérias e várias espécies de leveduras, além da *Saccharomyces cerevisiae*, que passam a ser considerados contaminantes (CHERUBIN, 2003; HEIST, 2009).

A atual tecnologia disponível para produção de etanol combustível no Brasil é susceptível a contaminação bacteriana. A terra levada do campo junto com a cana para as destilarias carrega grande quantidade de micro-organismos que podem prejudicar a fermentação e elevar os custos de produção, devido aos gastos com controle de contaminantes (LAVANHOLI, 2008). Outros fatores interferem na contaminação bacteriana proveniente da cana-de-açúcar entre os quais o tipo de colheita, variedades de cana, condições climáticas, pragas e doenças, tipos de transporte, condições de armazenamento, tempo decorrido entre o corte da cana e o seu processamento na unidade industrial e o estado da matéria-prima ao dar entrada na usina (limpa, suja, molhada, seca, queimada, nova, velha, deteriorada, com raízes, perfuradas por insetos, etc.) (ANGELIS, s.d.). Quanto maior a umidade do ar e a temperatura do ambiente, maior a perda de açúcar e maior a quantidade de micro-organismos que esta cana levará para a fábrica (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

Se a limpeza e desinfecção na indústria não forem rigorosas, os contaminantes podem continuar surgindo através dos tanques de armazenamento, tubulações, trocadores de calor, matéria-prima, e levedo adicionado ao sistema (NARENDRANATH, 2003). Toda a maquinaria onde ocorre a fermentação e a água utilizada (inclusive o ar em contato com o sistema) são possíveis fontes de contaminação (SCHELL et al., 2007). As tubulações por onde o mosto é transportado pode estimular infecções violentas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). No entanto a esterilização dos equipamentos pode não ser suficiente, pois isso não é capaz de controlar as bactérias que se originam das outras fontes de contaminação (SCHELL et al., 2007).

A contaminação bacteriana presente no caldo da cana e no mosto pode refletir a qualidade da matéria-prima utilizada, pois tanto o primeiro quanto o segundo são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos devido aos teores de nutrientes, alta atividade de água, pH e temperatura que ocorrem nos processos industriais de fermentação. No entanto, quando esses substratos passam a fazer parte do processo de fermentação suas características são completamente modificadas, podendo restringir o desenvolvimento de micro-organismos que crescem apenas nessas novas condições específicas (GALLO, 1990).

Os processos industriais de produção de etanol existentes no Brasil reutilizam o fermento em ciclos fermentativos consecutivos (processo Melle-Boinot). Durante o processo de centrifugação, os micro-organismos contaminantes também são reciclados juntamente com o fermento e agravam os problemas associados com a contaminação bacteriana. Essa

contaminação cria consideráveis prejuízos à indústria de fermentação, conforme os contaminantes começam a dominar o processo e subsequentemente diminuem a eficiência da produção de etanol (KRAM, 2008). Oliva-Neto e Yokoya (1994, 1997) mostraram que o processo de reciclo de células é capaz de estimular o crescimento de bactérias contaminantes, uma vez que restos de células de leveduras mortas também são recuperados pela centrifugação e servem de extrato de nutrientes que são fundamentais para o desenvolvimento de micro-organismos.

Os contaminantes bacterianos presentes nas linhas de caldo causam perdas de sacarose que variam de 1 kg.ton⁻¹ de cana quando as condições são satisfatórias e até 2,5 kg.ton⁻¹ quando não são adequadas. Quanto aos níveis de contaminação significativos, Amorim, Oliveira e Campos (1981) afirmam que quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a 10⁷ células.ml⁻¹ de mosto, pode ocorrer uma significativa queda no rendimento fermentativo. Estudos revelam que a contaminação bacteriana leva a uma queda no rendimento fermentativo na faixa de 14 a 90% do teórico quando a concentração de bactérias na fermentação atinge níveis de 10⁸ a 10⁹ células.ml⁻¹, verificando ainda quedas de 10 a 40% no rendimento associados a níveis de 10⁷ a 10⁸ células.ml⁻¹ (OLIVA-NETO, 1995). Devido a procedência da matéria-prima, Andrietta et al. (2006) afirmam que um processo de fermentação considerado sadio não trabalha com níveis de bactérias menores que 10⁵ células.ml⁻¹.

A contaminação bacteriana reduz a produtividade do processo através da redução da viabilidade, crescimento e capacidade fermentativa das leveduras (SCHELL, 2007; SKINNER; LEATHERS, 2004). A diminuição da eficiência do processo pode ocorrer devido aos seguintes mecanismos: consumo de açúcar e nutrientes disponíveis ou álcool produzido no processo pelo micro-organismo contaminante; morte de células de leveduras por toxinas ou subprodutos lançados ao meio pelo micro-organismo contaminante; excesso de ácido ou de outro produto utilizado para combater a contaminação; ou devido à floculação do fermento, a qual propicia perdas de células de levedura no fundo das dornas ou nas centrífugas (KRAM, 2008; AMORIM; OLIVEIRA 1982; LUSHIA; HEIST, 2005; NARENDRANATH, 2003). Existem situações em que a contaminação é tão intensa que a fermentação é totalmente perdida, sendo necessário reiniciar o processo (CHERUBIN, 2003).

Assim, justifica-se o interesse pelo controle microbiológico durante a fermentação alcoólica, objetivando-se, principalmente, o aumento do rendimento final do processo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; LUSHIA; HEIST, 2005; NARENDRANATH, 2003).

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997; LAVANHOLI, 2008; NARENDRANATH et al., 1997). Dentre os contaminantes, as bactérias gram-positivas produtoras do ácido láctico (LAB) são as que costumam causar os maiores problemas devido ao seu perfil anaeróbio facultativo, sua capacidade de tolerar altas temperaturas e baixo pH e pela sua habilidade de crescer rapidamente e sobreviver sob as condições nas quais o etanol é produzido (NARENDRANATH, 2003). As LAB que são capazes de produzir apenas ácido láctico a partir de moléculas de glicose fazem parte do grupo das bactérias homofermentativas, mas ainda assim há as heterofermentativas, capazes de produzir também ácido acético além de etanol, glicerol e dióxido de carbono (NARENDRANATH, 2003). Dentre as LAB se encontram espécies principalmente do gênero *Lactobacillus*, mas também de *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Enterococcus* (HEIST, 2009; LUSHIA; HEIST, 2005). Em um modelo de fermentação de melão por batelada-alimentada, *Lactobacillus fermentum* foi reportado como produtor de ácido láctico suficiente para inibir fortemente a fermentação realizada pela levedura após poucos ciclos de células (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994). *Streptococcus* também contém espécies produtoras de ácido láctico (CULLIMORE, 2000) e também *Lactococcus*. Bactérias gram-negativas do gênero *Acetobacter* utilizam moléculas de etanol para a produção de ácido acético e são também relatadas como contaminantes comuns mesmo não sendo capazes de crescer sem oxigênio (HEIST, 2009; LUSHIA; HEIST, 2005; NARENDRANATH, 2003).

Outro problema causado pela presença de bactérias em processos de fermentação, a floculação do fermento promove a diminuição da velocidade de fermentação, uma vez que diminui a área de contato entre a levedura e substrato, e ainda causa problemas operacionais, tais como o aumento do fundo de dorna e dificuldades na operação das centrífugas (ALCARDE; YOKOYA, 2003; LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001; OLIVA-NETO, 1990). *Lactobacillus fermentum* foi a primeira bactéria a ser citada como causadora de problemas de floculação (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991).

A formação de goma, que é um metabólito produzido por bactérias contaminantes (principalmente dextrans e/ou levânicos), é outra causa de problemas operacionais na indústria por provocar o aumento da viscosidade do caldo, causando entupimento nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor (TILBURY, 1975), além de também estimular a floculação (SERRA et al., 1979) e ajudar na formação de biofilmes. Segundo Yokoya (1989) dentre os principais micro-organismos produtores de goma estão espécies de *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc mesenteroides*. Kubota et al. (2008) demonstraram a capacidade da formação de biofilmes por espécies de *Lactobacillus*, sendo capazes de suportarem altas concentrações de etanol e ácido acético. *Bacillus* são organismos gram-positivos frequentemente oriundos do solo e produtores de levânico; são geralmente esporulantes e termófilos capazes de suportarem condições extremas (LOGAN; VOS, 2009) como as encontradas no processo de produção de açúcar que gera o melaço; portanto são potenciais contaminantes para o processo de produção de etanol e constituintes de biofilmes.

Os principais gêneros encontrados como contaminantes da fermentação alcoólica segundo Amorim e Oliveira (1982) pertencem aos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, entre outros.

Rodini (1985), avaliando amostras de mosto fermentado, identificou como as principais bactérias contaminantes presentes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Lactobacillus* sp., *Micrococcus lylae*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Planococcus* sp.

Silva (1988) constatou a presença de 38% de espécies de *Lactobacillus*, 12% de *Leuconostoc* e 3% de *Bacillus* em amostra de caldo de cana clarificado, pasteurizado e pré-resfriado.

Rosales (1989) isolou e identificou em amostras de fermento centrifugado, fermento tratado com ácido sulfúrico, mosto, vinho inicial e vinho final proveniente de destilarias as bactérias contaminantes: *Lactobacillus* sp. (45%), *Leuconostoc mesenteroides* (14,4%), *Bacillus* sp. (9,5%), *Acetobacter* sp. (7,4%), *Enterobacter* sp. (6,7%), *Sporolactobacillus* sp. (3,6%), *Micrococcus varians* (1,8%), *Staphylococcus* sp. (1,3%), *Pseudomonas fluorescens* (1,3%), *Escherichia coli* (1,3%) e *Citrobacter* sp. (0,5%).

Gallo (1990) caracterizou a microbiota em amostras de leite de levedura diluído, mosto de alimentação e vinho final, constatando a predominância de bactérias gram-positivas,

bastonetes e não-esporuladas. O gênero *Lactobacillus* foi o mais frequente (59,75%), com a identificação de *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, e *L. acidophilus*, entre outros. O gênero *Bacillus* correspondeu a 26,58% das bactérias identificadas, com as seguintes espécies: *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. lentus* e *B. pasteurii*. Ainda foram isolados representantes dos gêneros *Staphylococcus* (8,76%), *Pediococcus* (1,26%), *Streptococcus* (0,70%), entre outros.

Análises de leite de levedura sem tratamento ácido apresentaram *Lactobacillus fermentum* (62%), *L. murinus* (9%), *L. vaccinostercus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%) como principais contaminantes (OLIVA-NETO, 1990).

Um levantamento realizado em quatro destilarias do Brasil no período de safra de 2007 a 2008 encontrou a predominância de espécies de *Lactobacillus* pela identificação dos 489 isolados de melão e/ou caldo de cana cru, sendo os mais frequentes *L. fermentum* e *L. vini*; *Oenococcus* e *Weissella* também foram identificados (LUCENA et al. 2010).

Em processos que utilizam o milho como fonte de material para fermentação Skinner e Leathers (2004) relataram a presença maçante de espécies de *Lactobacillus* em até 77%, também encontrando a presença de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, entre outros. Skinner-Nemec, Nichols e Leathers (2007) constataram a capacidade de espécies de *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* provenientes de destilarias de formar biofilme quando inoculadas em bioreator.

A maioria dos trabalhos identificou e tornou evidente a predominância de bactérias gram-positivas e em forma de bastonetes no processo de fermentação alcoólica com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*.

Atualmente, a contagem e identificação de bactérias contaminantes da fermentação são feitas através dos métodos da microbiologia clássica de plaqueamento e cultivo com posterior contagem e identificação das colônias e microscopia ótica. São métodos que apresentam baixo custo e são práticos, porém, em geral levam mais tempo, devido à necessidade de cultivo das bactérias, do que os métodos moleculares, e não conseguem identificar todas as bactérias presentes (GIRAFFA; CARMINATI, 2008; MAUKONEN et al., 2003; MUTHAIYAN; RICKE, 2010; QUIGLEY et al., 2011). Uma alternativa seria o sequenciamento da região 16S do rRNA da bactéria que se deseja identificar. O sequenciamento, assim como as técnicas de plaqueamento e microscopia ótica já vem sendo utilizado para tal fim, porém também é uma

técnica demorada, pois exige o isolamento da bactéria a ser identificada, além de apresentar alto custo.

A técnica de T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) apresenta-se como uma alternativa viável para identificação das bactérias contaminantes da fermentação uma vez que é um método rápido, de alto poder de resolução e apresenta custos menores do que o sequenciamento.

2.3 *Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)*

Métodos moleculares vêm revolucionando o estudo dos micro-organismos e suas atividades. Baseados na amplificação de ácidos nucléicos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) como a análise de T-RFLP, por exemplo, permitem aos pesquisadores compararem diferentes comunidades de micro-organismos derivados de diferentes ambientes (MARSH, 1999). Esses métodos precisam ser rápidos, reprodutíveis, econômicos e de fácil manipulação (THIES, 2007). A aplicação dessas técnicas no estudo de comunidades microbianas tem superado limitações inerentes às técnicas tradicionais de isolamento e cultivo, por exemplo, permitindo a detecção de organismos ainda não cultivados (GIRAFFA; CARMINATI, 2008). A técnica de T-RFLP é bastante empregada para caracterizar as comunidades microbianas em diferentes ambientes, como solos de floresta, solos poluídos, sedimentos, estruturas de plantas, trato digestivo de minhocas, entre outros (THIES, 2007).

Originalmente essa técnica foi desenvolvida por Avaniss-Aghajani et al. (1996) para identificar microbactérias em amostras clínicas. O potencial da técnica para analisar variações entre genes 16S rRNA amplificados de diferentes bactérias e obter informações sobre a estrutura de comunidades microbianas foi demonstrado por Liu et al. (1997) e Clement et al. (1998). A técnica de T-RFLP tem sido usada em estudos de populações de bactérias (LIU; MARSH; FORNEY, 1998), *Archaea* (MAAREL et al., 1998) e eucariotos (MARSH, 1999) em habitats naturais.

A análise de T-RFLP determina o polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição terminal (T-RFs) de um produto de amplificação por PCR digerido com enzimas de

restrição. O DNA da comunidade que se deseja analisar é extraído, seguido pela amplificação por PCR do gene 16S rRNA utilizando *primers* específicos do domínio ou grupo, construídos com o auxílio de 3000 a 5000 sequências de bases de dados (TIEDJE et al., 1999). Os *primers* utilizados são marcados com fluoróforo na extremidade 5' terminal; assim somente o fragmento terminal da digestão de restrição é detectado, e seu tamanho determinado por um sequenciador automático. Alguns diferentes fluoróforos têm sido utilizados com sucesso na análise, incluindo HEX, FAM e ROX (THIES, 2007). Os amplicons gerados pela PCR são então digeridos com enzimas de restrição adequadas. As enzimas apropriadas a serem utilizadas para cada caso podem ser determinadas previamente através de análises *in silico* com sequências de 16S rRNA (ENGBRETSON; MOYER, 2003; MOYER et al., 1996). Os produtos da digestão são então carregados em um sequenciador automático ABI e a corrida é realizada em um modo de varredura com tamanho interno padrão incluído em cada linha de leitura (LIU et al., 1997).

Os tamanhos dos T-RFs marcados com o fluoróforo são convertidos em um eletroferograma, onde cada pico representa um T-RF. O processamento dos dados se dá pela conversão dos eletroferogramas em uma matriz, cada coluna representando uma amostra e cada linha representando um T-RF que é encontrado em uma amostra. As opções de *software* incluem o *GeneScan*TM ou *Gene Mapper*TM (ABI) e *PeakScanner* v1.0 (Life Technologies). Estes programas calculam o tamanho do fragmento de restrição terminal bem como a intensidade de fluorescência (altura ou área do pico). Um esquema completo da análise por T-RFLP é apresentado na Figura 1.

Com os dados gerados diversos métodos multivariados podem ser utilizados para visualização de relações de similaridade entre as amostras, por exemplo, análise de componentes principais (PCA) (BLACKWOOD et al., 2003).

A técnica de T-RFLP apresenta as vantagens de ser eficiente, confiável, e de alta reprodutibilidade; ser capaz de providenciar uma composição qualitativa de diferentes populações dentro de comunidades microbianas relativamente simples após avaliação dos fragmentos marcados; e também por permitir avaliar relações filogenéticas entre os membros da comunidade (GIRAFFA; CARMINATI, 2008). A relação entre os tamanhos dos amplicons e a filogenia do gene pode ser determinada por comparação com sequências de espécies bacterianas previamente publicadas, usando ferramentas presentes na WEB como através da ferramenta disponível no site *The Microbial Community Analysis MiCA 3*

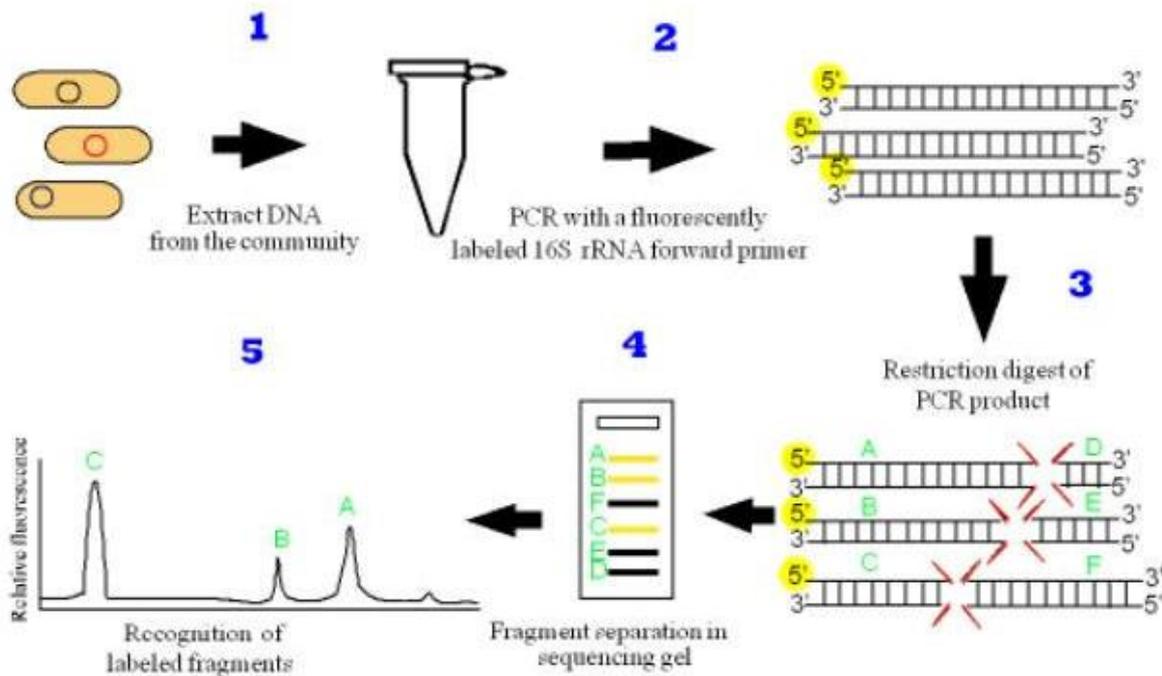


Figura 1 – 1) O DNA é extraído da amostra de interesse; 2) O gene de interesse é amplificado usando a técnica de PCR com um *primer* marcado com fluorescência; 3) Produtos de PCR de tamanho igual ou similar marcados com fluorescência na extremidade final. Após a purificação, os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição, que geram fragmentos de diferentes tamanhos. 4) Estes fragmentos são separados em gel de eletroforese ou capilaridade. 5) Um leitor a laser detecta os fragmentos marcados e gera um perfil baseado no comprimento dos fragmentos. Fonte: GRUNTZIG et al., (2002).

(*Microbial Community Analysis III*) *Phylogenetic Analysis of T-RFLP (PAT+)* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>) (SHYU et al., 2007). Essa ferramenta permite uma comparação, através do fornecimento de informações prévias sobre *primers* e enzimas utilizados para a realização do T-RFLP, entre os dados obtidos pelo T-RFLP e os T-RFs gerados pela digestão virtual de sequências do gene 16S rRNA existentes em banco de dados, permitindo assim inferir uma identificação. Belila, Snoussi e Hassan (2012) mostraram que a aplicação destes procedimentos descritos foi capaz de promover a identificação de micro-organismos presentes em amostras de águas residuais eutrofizadas. Os mesmos autores sugerem que os resultados dessa técnica servem para indicar pistas da presença de grupos contaminantes nas amostras, mas os resultados não devem ser considerados como definitivos, sendo necessários melhores aperfeiçoamentos (pelo uso de quanto mais enzimas melhor ou pelo uso de *primers* grupo-específicos) para alcançar um resultado mais preciso.

2.4 PCR quantitativo

A detecção de micro-organismos contaminantes é dificultada caso eles estejam presentes em pequenas quantidades no material a ser analisado. Além disso, métodos convencionais de detecção de contaminantes no processo de produção de bioetanol, como cultura microbiológica, requerem de 24 horas a alguns dias para que os micro-organismos possam se multiplicar. Também, alguns micro-organismos podem ser dependentes da presença de substâncias específicas que viabilizam seu crescimento e desenvolvimento; dessa forma eles não são capazes de se multiplicar mesmo em meios altamente nutritivos preparados em laboratório, não apresentando crescimento esperado necessário para possibilitar a sua detecção e quantificação (JESPERSEN; JAKOBSEN, 1996). Por essa razão, métodos de detecção independentes de cultura mais rápidos e mais sensíveis estão sendo requeridos (MUTHAIYAN; RICKE, 2010). Recentemente vários métodos rápidos para quantificação de contaminantes vêm sendo desenvolvidos entre eles: técnicas de bioluminescência, imunoenaios, citometria de fluxo, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) entre outros (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

A técnica PCR tem sido usada para amplificação de fragmentos de DNA e se expandiu progressivamente desde os anos 90. Atualmente, tem sido considerada uma ferramenta muito versátil para análises diagnósticas que envolvem quantificação de microrganismos em pesquisa ou em testes de rotina em larga escala (COCKERILL; SMITH, 2002). Novos avanços foram obtidos com o desenvolvimento do PCR quantitativo, usado para detecção de ácidos nucleicos de alimentos, organismos geneticamente modificados, vetores usados em protocolos de terapia gênica, vírus, e em outras áreas de microbiologia aplicada na saúde animal e humana (AHMED, 2002; KLEIN, 2002).

Alguns trabalhos têm sido realizados utilizando a técnica de qPCR para quantificação de micro-organismos produtores de ácido lático presentes em amostras probióticas (KAO; LIU; SHYU, 2007); em cáries dentárias (BYUN et al., 2004); e também de bactérias produtoras de ácido acético contaminantes da produção de vinho e vinagre (TORIJA et al., 2010), todos através da utilização de sequências do gene 16S rRNA. Em comparação com métodos de cultivo tradicionais, Nadkarni et al. (2002) conseguiram com sucesso quantificar células de bactérias totais presentes em cárie dentária através da técnica de qPCR. Guilbaud et

al. (2005) aplicaram a técnica para a quantificação de *Listeria monocytogenes* em biofilmes presentes em produtos alimentícios.

PCR quantitativo é baseado na detecção em tempo real da concentração de ácidos nucleicos no qual a fluorescência aumenta conforme o acúmulo de produtos durante cada ciclo de amplificação (RAEYMAEKERS, 2000). Utilizando esta técnica, uma fase log pode ser identificada facilmente e os dados aparecem na tela do computador que serão comparados com curvas padrões (MADANI; SUBBOTIN; MOENS 2005). PCR quantitativo em tempo-real tem as vantagens de ser rápido, preciso e confiável quando comparado com PCR tradicional (SCHAAD; FREDERICK, 2002). Comparado com técnicas tradicionais de cultivo, ensaios de qPCR podem demorar apenas de 4 a 6 horas a partir da preparação do DNA a ser analisado até as análises finais dos dados (MUTHAIYAN; RICKE, 2010). Podem ser utilizados diferentes reagentes tais como *SYBR Green*, *TaqMan*, entre outros. Além disso, esta técnica exige um menor consumo de tempo devido a sua rapidez e capacidade de suportar grande quantidade de amostras (HERMANSSON; LINDGREN, 2001).

O método que utiliza fluorescência *SYBR Green* possui a vantagem de ser mais simples, pois a ação da fluorescência não depende de uma sequência nucleotídica específica. Essa fluorescência pode ser utilizada para detectar qualquer produto de PCR delimitado por *primers* de interesse e se liga a qualquer fita dupla de DNA (MADANI; SUBBOTIN; MOENS, 2005). Contudo, tem a desvantagem de ligar-se a produtos não específicos incluindo dímeros de *primers* (MADANI; SUBBOTIN; MOENS, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a relação entre as comunidades microbianas dos biofilmes e de outros diferentes pontos de coleta do sistema de produção de bioetanol em diferentes momentos e promover a identificação e quantificação dos principais contaminantes através das técnicas moleculares T-RFLP e qPCR

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Definir através de análises *in silico* as enzimas de restrição adequadas para a utilização em experimentos de T-RFLP;
- ✓ Encontrar os índices de diversidade das amostras de cada ponto de coleta e verificar suas relações através de análise dos componentes principais (PCA) a partir dos resultados do T-RFLP;
- ✓ Promover a identificação dos principais contaminantes através da comparação com banco de dados de sequências *on-line* a partir dos resultados do T-RFLP;
- ✓ Desenhar *primers* sobre sequências do gene 16S rRNA para serem utilizados na quantificação dos contaminantes mais comuns encontrados nas amostras;
- ✓ Obter por qPCR o número de cópias do gene 16S rRNA por unidade de massa ou volume de amostra dos contaminantes mais comuns;
- ✓ Estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias por unidade de massa ou volume de amostra dos contaminantes mais comuns.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

As coletadas foram realizadas na Usina da Pedra localizada no município de Serrana, São Paulo, Brasil, em dois períodos distintos. A primeira foi realizada em Novembro de 2010 e a segunda em Agosto de 2011. Um sistema de fermentação piloto para testes de fermentação com alto teor alcoólico forneceu as amostras. O processo ocorre em batelada alimentada e o material utilizado como fonte de açúcar é o melaço proveniente do processo de produção de açúcar. O mosto a ser fermentado é produzido misturando-se água de poço artesiano ao melaço (pH médio do melaço: 5,26), diluindo este a 60%. A fermentação é realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* que compreende 10% do volume do vinho final de fermentação; o processo de fermentação segue o sistema de Melle-Boinot, com a reciclagem de células de leveduras, tratadas com ácido sulfúrico 30% para promover a descontaminação bacteriana (pH médio do levedo tratado: 4,28). O tempo médio da fermentação é de 16 horas. A temperatura da fermentação é mantida constantemente a 27°C por um trocador de calor que utiliza água de poço artesiano refrigerada por um *chiller* que não entra em contato com o mosto sendo fermentado. Os rendimentos fermentativos se mantêm na faixa de 90-92% sendo atingidos teores alcoólicos máximos na faixa de 16-17%. O pH médio do vinho se mantêm por volta de 5,18.

Foram coletadas trélicas de cada uma das amostras: biofilmes visualmente presentes no prato de centrífuga (BCEN), na parede da dorna de fermentação (BD) no trocador de calor (BT) e na tubulação que injeta água no sistema (BH2O); amostras de melaço (MEL), mosto (MST), levedo (pé-de-cuba PC), levedo tratado (PCT) com H₂SO₄ (somente na segunda coleta) e vinho delevedurado (VINHO). Os pontos de coleta podem ser visualizados na Figura 2.

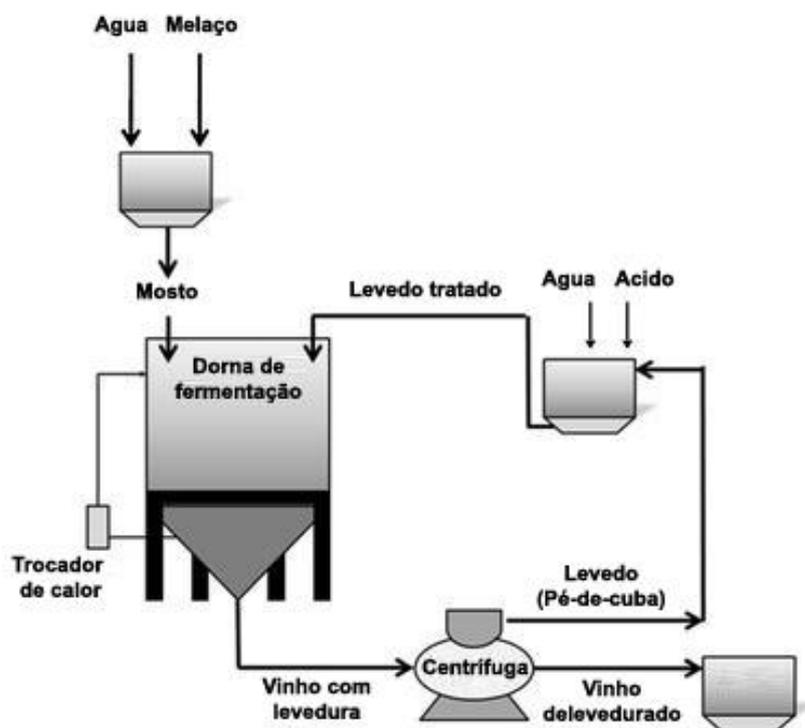


Figura 2 – Sistema simplificado do processo Mellet-Boinot de produção de bioetanol (modificado de Amorim et al. (2011)).

As amostras foram depositadas em tubos do tipo Falcon ou tubos de microcentrífuga e encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) sob refrigeração e mantidas a -80°C para realização das análises moleculares.

4.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA total das amostras coletadas na destilaria foi utilizado o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Foram realizadas extrações para cada amostra coletada (trélicas), como descrito a seguir.

As amostras de biofilme foram pesadas e em seguida lavadas duas vezes com solução EDTA salina (EDTA 0,01 mM pH 8,0, NaCl 0,15 mM) agitando rapidamente para ajudar na dissociação do material, recuperando-se o pellet após centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. As amostras de MEL foram diluídas a 60% com água ultrapura (Milli-Q)

autoclavada e assim como as amostras de MST, PC e VINHO foram centrifugadas de 12.000-14.000 rpm por 5 minutos em tubos plásticos de 1,7 ml. O volume de amostra centrifugado variou de 1,6 a 5,1 ml, o suficiente para a formação de um pellet consistente. Todos os pellets foram tratados com 300 µl de lisozima 10 mg.ml⁻¹ a 37°C por 15 minutos; após esta etapa às amostras de biofilme foram agitadas com 200 mg de pérolas de vidro 0,1 mm para auxiliar na dissociação do material. Em seguida a todas as amostras foram adicionados 700 µl de tampão de extração (NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM pH 8,0, polivinilpirrolidona (PVP40) 1%, CTAB 2%, 100 µg.ml⁻¹ de proteinase K, β-Mercaptoetanol 0,2 %) e então incubou-se a 65°C por 30 minutos. Foram então adicionados 650 µl de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) (CIA) em cada amostra seguida de homogeneização e centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos. A fase aquosa foi transferida pra um novo tubo e então tratada com 650 µl de fenol, seguida de homogeneização e centrifugação por 14.000 rpm por 7 minutos. A fase aquosa sobrenadante foi transferida para um novo tubo onde novamente foram adicionados 650µl de CIA. Procedeu-se a homogeneização e centrifugação por 7 minutos a 14.000 rpm. A fase sobrenadante foi transferida a um novo tubo onde 200 µl de tampão de extração sem proteinase K foram adicionados e em seguida, mais 650 µl de CIA. Prosseguiu-se com a homogeneização e centrifugação por 7 minutos a 14.000 rpm. A fase sobrenadante foi novamente transferida a um novo tubo, onde mais 650 µl de CIA foram adicionados. A amostra foi homogeneizada e centrifugada por 7 minutos a 14.000 rpm. A fase sobrenadante foi coletada e transferida a um novo tubo onde o DNA foi precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol e centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e 250 µl de etanol 70% foram adicionados para a lavagem do precipitado. A amostra foi então centrifugada por 2 minutos para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi secada em concentrador de DNA por 10 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 40-50 µl tampão Tris-RNase (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 10µg.ml⁻¹ de RNase). A amostra foi incubada à 37°C por 30 minutos, para digestão do RNA, e em seguida armazenada a -20°C.

A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) corado com *GelRed*TM (Biotium Inc.) (1,5 µl/50 ml de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) utilizando como padrão molecular 2µl de *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e então fotodocumentado.

As amostras de DNA também foram quantificadas em espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies) com leitura D.O. = 260 nm. Todas as amostras de DNA foram armazenadas em freezer, à -20°C.

4.3 Análises de T-RFLP

4.3.1 Análise de sequências *in silico* para definição de uso das enzimas de restrição

Sequências do gene 16S rRNA de algumas bactérias comumente contaminantes do processo de fermentação alcoólica (Tabela 1) previamente isoladas e sequenciadas pela empresa Fermentec em trabalhos anteriores foram obtidas para análise *in silico*.

Tabela 1 – Relação de espécies fornecedoras de sequências do gene 16S rRNA utilizadas em simulação *in silico*.

<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Acetobacter tropicalis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Clostridium sp.</i>
<i>Enterobacter sp.</i>
<i>Gluconacetobacter sp.</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<i>Weissella cibaria</i>

Essas análises foram realizadas para determinar as enzimas de restrição mais adequadas para a utilização pela técnica de T-RFLP, gerando T-RFs com comprimento dentro da faixa detectável pelos equipamentos e reagentes utilizados (entre 30 e 650 pb, preferencialmente). Para isso utilizou-se o programa *Cleaver* (JARMAN, 2006). As enzimas de restrição testadas nas análises *in silico* foram *AluI*, *BstUI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HindIII*, *HinfI*, *MseI*, *MspI*, *RsaI* e *TaqI*. Foram escolhidas as enzimas com maior capacidade de distinguir as espécies bacterianas utilizadas.

4.3.2 Amplificação do 16S rRNA ribossomal

Para a análise de T-RFLP, o gene 16S rRNA bacteriano foi amplificado a partir do DNA total das amostras utilizando-se os *primers* universais para bactérias 27f (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') (marcado com fluoróforo FAM) e 1492r (5' ACC TTG TTA CGA CTT 3') (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). O procedimento de PCR foi realizado em um volume total de 50 µl contendo 1µl do DNA total (ou diluído 1:10) extraído, tampão de PCR 1X, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 1mM, 400 µg.ml⁻¹ de BSA, 1,25U de Taq DNA Polimerase, 5 pmol de cada *primer* e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Life Technologies) nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; e uma extensão final de 72°C por 15 minutos. Uma alíquota de 3 µl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e posteriormente foto-documentado.

4.3.3 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, adicionou-se ao produto de PCR 100 µl de *Capture buffer type 2* e a mistura foi transferida

para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000 g por 30 segundos. O filtrado que passou pela coluna foi descartado. Na coluna GFX adicionou-se 500 µl de *Wash buffer type 1* e centrifugou-se a 16.000 g por 30 segundos, descartando o filtrado. A coluna foi transferida para um novo tubo e, para a eluição do produto de PCR, foram adicionados 20 µl do *Elution buffer type 4* no centro da membrana. Incubou-se a mistura por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 16.000 g por 1 minuto para recolher o produto de PCR purificado. Uma alíquota de 3 µl deste produto foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 µl de *Low mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e foto-documentado.

4.3.4 Reação de restrição dos produtos de PCR para análise de T-RFLP

A reação de restrição (digestão) foi realizada em volume total de 15 µl contendo aproximadamente 60-70 ng do produto de PCR purificado, tampão específico de cada enzima 1 X, 0,6 U de enzima de restrição (10 U.µl⁻¹) além de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. A incubação foi realizada por 3 horas em termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Life Technologies) em temperatura ideal de atividade de cada enzima, seguida de um passo de inativação de 10 minutos também em temperatura adequada. As enzimas de restrição utilizadas foram selecionadas a partir do resultado das análises realizadas descritas no tópico *4.3.1 Análise de sequências in silico para definição de uso das enzimas de restrição*.

4.3.5 Análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA de *Bacteria*

A análise dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi feita em sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Life Technologies). Para o carregamento das amostras no sequenciador, o produto precipitado foi ressuspendido em mistura contendo 9,75 µl de Formamida HiDi e 0,25 µl de padrão de comprimento *GeneScanTM – 500 ROXTM Size Standard* (Life Technologies). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas por 5

minutos a 95°C e resfriadas em gelo por 4 minutos. A determinação do comprimento dos fragmentos terminais de restrição foi feita com os softwares *GeneMapper 3.0* e *PeakScanner v1.0* (Life Technologies), com base na comparação com o padrão. Os dados foram então exportados para uma planilha eletrônica no programa *Excel* (Microsoft).

4.3.6 Processamento dos dados para geração de índice de diversidade e análise multivariada (PCA)

Uma linha base limite de 50 unidades de fluorescência foi usada para discriminar os “picos verdadeiros” dos ruídos do *background* proveniente da técnica, e T-RFs menores que 50 pares de base e maiores que 800 foram eliminados de todos os dados (CULMAN et al., 2008).

Os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos, onde os valores absolutos referentes à intensidade dos picos no eletroferograma e correspondentes aos comprimentos dos fragmentos foram apresentados na forma de valores percentuais de detecção. Essa transformação dos dados foi calculada dividindo cada valor de tamanho de pico pelo valor total dos picos de uma amostra. Isso é análogo em transformar cada altura de pico em dados de porcentagem em relação ao total de valores de altura de pico em uma amostra (CULMAN et al., 2008).

Essa matriz de dados foi utilizada para cálculos de índice de diversidade de *Shannon* de cada amostra para cada enzima através do programa *Primer6* (Plymouth Marine Laboratory). A variação foi analisada por ANOVA no programa ASSISTAT 7.6 (SILVA, 1996) empregando a análise de comparação de médias pelo Teste de Tukey.

Essa matriz foi também transformada em uma matriz de distância, usando a medida de *Hellinger* (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001) para tornar possível as Análises de Componentes Principais (PCA) para cada enzima utilizada através do programa *Canoco for Windows 4.5* (Biometris).

4.3.7 Comparação dos resultados T-RFLP com banco de dados e inferência filogenética

Uma comparação dos resultados das análises de T-RFLP com bancos de dados disponíveis na internet foi feita para descobrir as espécies bacterianas possivelmente presentes nas amostras.

Através de algoritmos disponíveis no site *The Microbial Community Analysis MiCA 3 (Microbial Community Analysis III) Phylogenetic Analysis of T-RFLP (PAT+)* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>) (SHYU et al., 2007) foram gerados bancos de dados com os tamanhos esperados dos T-RFs para milhares de espécies bacterianas. Para a montagem dos bancos o programa foi alimentado com as sequências dos *primers* utilizados, as enzimas de restrição utilizadas e o intervalo de comprimentos de T-RFs possíveis de serem encontrados nas amostras. O programa realiza a PCR *in silico*, utilizando sequências 16S rRNA do banco de dados do RDP *release 10 (Ribosomal Data Base Project)* (COLE et al., 2009), que contém milhões de sequências do gene (retornando apenas sequências classificadas como “*Quality = Good*” e “*Size ≥ 1200 pb*”). Em seguida, o sítio de restrição das enzimas selecionadas é procurado dentro dos fragmentos do gene delimitados pelos *primers*. Assim, é determinado o comprimento do fragmento de restrição terminal esperado para cada espécie, dada uma combinação *primers-enzima* selecionada.

Os bancos de dados gerados foram armazenados em planilhas eletrônicas. Utilizando fórmulas do programa *Excel* (Microsoft), T-RFs encontrados nas análises com uma dada enzima são comparados aos bancos de dados gerados para a mesma enzima. Cada T-RF encontrado na análise com uma determinada enzima de restrição pode corresponder à várias espécies de bactérias. Por isso, é necessário analisar a mesma amostra com várias enzimas, e cruzar os dados verificando qual espécie ou espécies apareceram nos resultados com o maior número possível de enzimas. O número de enzimas utilizadas neste trabalho foi determinado pelas análises *in silico*. Somente espécies encontradas nos resultados de todas as enzimas utilizadas eram consideradas presentes na amostra. As análises foram feitas separadamente para cada réplica de extração de DNA de cada amostra. A lista final de espécies presentes em cada amostra foi obtida através da soma dos registros encontrados em cada réplica. A Figura 3 traz um esquema simplificado explicando como a análise funciona.

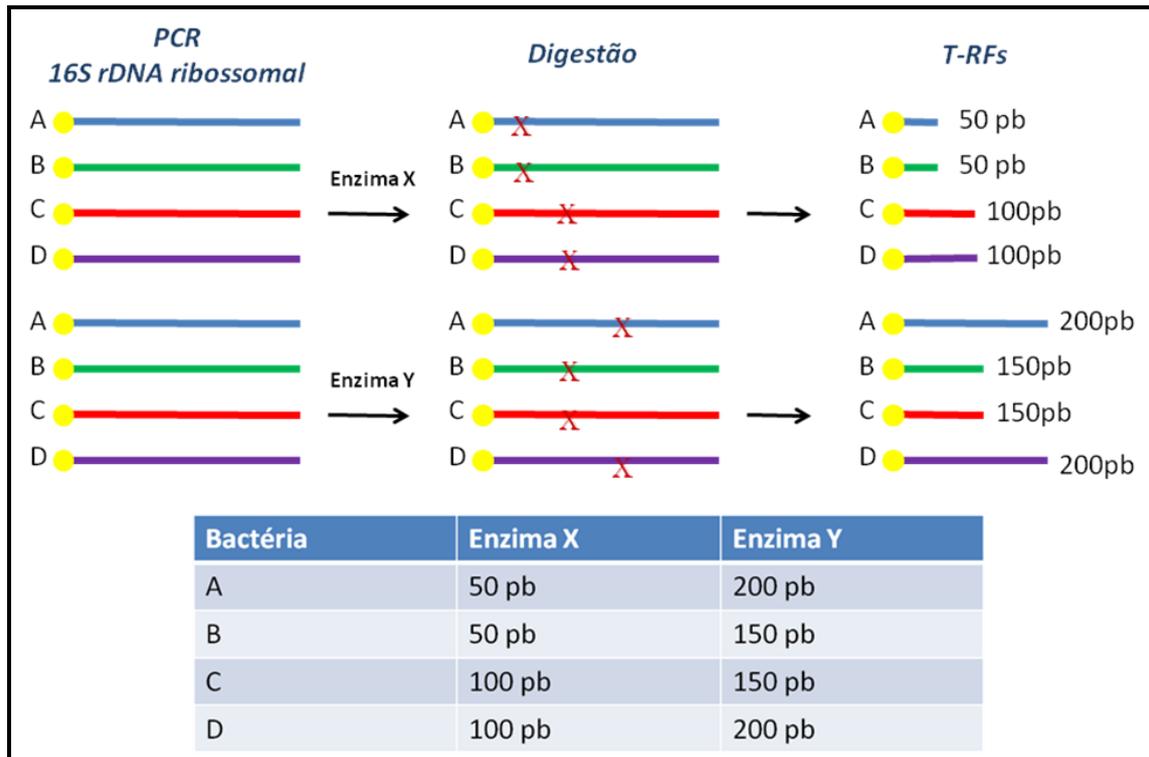


Figura 3 - Simulação explicando o funcionamento da análise filogenética dos resultados do T-RFLP. As espécies bacterianas A, B, C e D compõem uma amostra analisada. Após a PCR, com *primers* para o gene 16S rRNA, são gerados fragmentos de DNA de mesmo tamanho para todas as amostras. O corte com a enzima X gera dois tamanhos de T-RFs diferentes, 50 pares de bases para as espécies A e B, e 100 pares de bases para C e D. Logo, A e B não podem ser distinguidas através da análise com a enzima X, o mesmo ocorre com C e D. A análise com a enzima Y produz novamente apenas dois tamanhos de fragmentos diferentes, 200 pb para A e D, e 150 pb para B e C. Logo, somente com os resultados dessa enzima, não podemos distinguir A de D, e nem B de C. Porém, ao cruzarmos os dados das análises das duas enzimas, vemos que cada espécie apresenta uma combinação única de fragmentos nas análises com as duas enzimas, podendo ser distinguidas através desses resultados. Se a tabela ilustrada fosse nosso banco de dados, poderíamos perguntar a ele, qual espécie corresponde a um fragmento de 50 pb para a enzima X e a um fragmento de 200 pb para a enzima Y. E teríamos como única resposta: a espécie A.

4.3.8 Avaliação de capacidade quantitativa da técnica de T-RFLP

Foram utilizadas diferentes quantidades de produto de PCR purificado (25 ng, 50 ng, 100 ng, 125 ng e 150 ng) em procedimentos de digestão para determinar a capacidade quantitativa da técnica de T-RFLP. Os testes foram realizados com produtos de PCR provenientes de DNA referente a duas amostras industriais e a dois isolados bacterianos escolhidos aleatoriamente (não extraídos neste trabalho), utilizando as enzimas *AluI* (Fermentas) e *HaeIII* (Fermentas) nas mesmas condições descritas nos tópicos anteriores. As

análises foram realizadas por comparações visuais entre os picos apresentados pelos eletroferogramas.

4.4 Desenvolvimento e testes de *primers* para utilização em qPCR

4.4.1 Desenho, análise e seleção dos *primers*

Sequências do 16S rRNA de bactérias resultantes da técnica T-RFLP foram recuperadas do banco de dados *GenBank* através de seus números de acessos. Em seguida foram alinhadas através da utilização do *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) disponível no programa *Bioedit* (HALL, 1999). Uma lista de *primers* para cada táxon de interesse foi gerada pelo programa *Primrose* (ASHELFORD; WEIGHTMAN; FRY, 2002) baseando-se numa sequência consenso entre as sequências alinhadas. Os parâmetros foram ajustados para gerar *primers* de aproximadamente 20 nucleotídeos contendo no máximo 3 bases degeneradas por sequência e priorizou-se pela escolha de *primers* com alta temperatura de *melting* (TM). O código utilizado para as bases degeneradas foi de acordo com o determinado pelo NC-IUB (CORNISHBOWDEN, 1985). Para a checagem de formação de estruturas secundárias nos *primers*, como *hairpins*, dímeros e *cross-dímeros* foi utilizado o programa *PrimersList* (KALENDAR; LEE; SCHULMAN, 2011). Os *primers* foram avaliados quanto a sua complementaridade (checagem de especificidade *in silico*) com sequências de 16S rRNA disponíveis no banco de dados do RDP 10 utilizando a ferramenta *Probe Match* (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>) (COLE et al., 2009).

4.4.2 Obtenção de isolados bacterianos para teste dos *primers*

Espécies bacterianas representantes dos táxons selecionados foram cedidos gentilmente pelo banco de cultura de isolados da empresa Fermentec. Esses isolados foram previamente caracterizados e identificados por procedimentos microbiológicos, bioquímicos e moleculares executados na empresa. As culturas foram recebidas em meio de cultura líquido e

submetidas a extração de DNA genômico. O DNA já extraído de algumas culturas obtidas anteriormente a este trabalho pela Coleção de Microrganismos e Culturas de Células da Alemanha – DSMZ (*German Collection of Microorganism and Cell Cultures* – www.dsmz.de) também foi utilizado para os testes dos *primers*.

4.4.3 Extração de DNA de isolados

Adicionou-se 1,5 ml do meio de cultura líquido contendo os microrganismos em um tubo eppendorf. Centrifugou-se por 3 minutos a 10.000 g e o sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido até ser obtido um pellet de cerca de 4 mm de diâmetro. As células foram ressuspensas em 300 µl de lisozima (10 mg.ml⁻¹) e mantidas a 37°C por 15 minutos. O DNA de tal material foi extraído usando o kit *Power soil DNA Extraction* (MoBIO) de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, a suspensão de células foi adicionada em um microtubo do kit contendo micro-esferas de vidro (tubo PowerBead 2 ml). Em seguida, o microtubo foi agitado por 5 segundos em vortex e adicionou-se 60 µl da solução C1 invertendo o tubo várias vezes; o tubo foi preso ao Adaptador MoBIO Vortex e agitado vigorosamente por 10 minutos à velocidade máxima; após, o tubo foi colocado para centrifugação a 10.000 g por 30 segundos; o sobrenadante (aprox. 450 µl) foi transferido para um novo tubo e então foi adicionado 250 µl da solução C2 e agitado novamente por 5 segundos; após essa etapa, incubou-se a 4°C por 5 minutos; após o tempo de incubação, centrifugou-se a 10.000 g por 1 minuto e 600 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo; adicionou-se 200 µl da solução C3 e agitou-se por 5 segundos; após essa etapa, incubou-se novamente a 4°C por 5 minutos; após o tempo de incubação, centrifugou-se a 10.000 g por 1 minuto e transferiu-se 750 µl do sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 1200 µl da solução C4 e agitou-se por 5 segundos; após essa etapa, foram carregados 675 µl da solução no tubo contendo a coluna e então foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 g; a solução coletada no tubo foi descartada e mais 675 µl foram carregados na coluna e então centrifugados por 1 minuto a 10.000 g; a solução coletada no tubo foi novamente descartada e finalmente, o restante foi aplicado na coluna e centrifugado novamente nas condições anteriores; após, adicionou-se 500 µl da solução C5 na coluna e centrifugou-se a 10.000 g por 30 segundos; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo vazio por mais 1 minuto a 10.000 g; após essa etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo e foram

adicionados 50 µl da solução C6 no centro da coluna; centrifugou-se por 30 segundos a 10.000 g e obteve-se o DNA extraído das amostras.

A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) corado com *GelRed*TM (Biotium Inc.) (1,5 µl/50 ml de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) utilizando como padrão molecular 2µl de *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e então fotodocumentado.

As amostras de DNA também foram quantificadas em espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies) com leitura D.O. = 260 nm. Todas as amostras de DNA foram armazenadas em freezer, à -20°C.

4.4.4 Ajustes para amplificação em reação de PCR para checagem dos *primers*

Os testes foram conduzidos geralmente utilizando um *primer* do táxon-específico desenvolvido neste trabalho juntamente com um dos seguintes *primers* universais já descritos em literatura para o gene 16S rRNA de *Bacteria* (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* 16S rRNA universais de *Bacteria* utilizados juntamente com os *primers* delineados neste trabalho.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Temperatura de melting (TM)	Referência
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	57°C	(WEISBURG ET AL., 1991)
341-357f	CCTACGGGAGGCAGCAG	61°C	(LANE, 1991)
357-341r	CTGCTGCCTCCCGTAGG	61°C	(LANE, 1991)
685-704f	GTAGSGGTGAAATSCGTAGA	53°C	(LANE, 1991)
704-685r	TCTACGSATTTACCSCTAC	53°C	(LANE, 1991)
1099-1114f	GCAACGAGCGCAACCC	63°C	(LANE, 1991)
1114-1099r	GGGTTGCGCTCGTTGC	63°C	(LANE, 1991)
1492r	ACCTTGTTACGACTT	49,4°C	(AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995)
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	56°C	(WEISBURG ET AL., 1991)

As reações de amplificação foram realizadas em solução contendo de 2 a 5 ng do DNA total extraído dos isolados, tampão de PCR 1X, dNTPs 100 μ M, 1U de *Taq* DNA Polimerase e 5 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*). As concentrações de MgCl₂ puderam variar de acordo com o ajuste de especificidade de cada *primer* (entre 1,5 e 3 mM).

Com o propósito de otimizar a reação, de modo a favorecer a amplificação de um fragmento apenas no táxon de interesse, foram realizados testes de gradiente de temperatura de anelamento dos *primers* com o objetivo de aumentar a especificidade dos mesmos. As reações foram feitas em termociclador *MyGenie 96 Gradient Thermal Block* (Bioneer Corporation) para calcular um gradiente onde a temperatura de anelamento variou de 53°C a 69°C. As condições de amplificação foram: 4 minutos a 96°C, 30 a 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento por 30 segundos em temperatura de acordo com o ajustado, extensão por 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos resultantes das amplificações foram visualizados aplicando 3 μ l da reação em gel de agarose de 1% (p/v) corado com *GelRed*TM (Biotium Inc.) (1,5 μ l/50 ml de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004) utilizando como padrões de peso molecular *DNA Mass Ladder* (Life Technologies) e/ou 100 pb *DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e então fotografado.

4.4.5 Construção de biblioteca com fragmentos amplificados pelos *primers*

Os fragmentos foram gerados através das reações de PCR de acordo com as condições descritas. Após esse passo, os fragmentos foram purificados utilizando o Kit *GFX*TM *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante e os mesmos procedimentos do tópico 4.3.3 *Purificação dos produtos de PCR*.

4.4.6 Clonagem dos produtos de PCR

O produto amplificado e purificado da PCR foi clonado em vetor *pGEM[®]-T Easy*, de acordo com as instruções do fabricante do Kit *pGEM[®]-T Easy Vector* (Promega). A reação de ligação do produto de PCR purificado ao vetor foi realizada utilizando: 3 U de T4 DNA Ligase; tampão T4 Ligase 1X; 50 ng do vetor *pGEM[®]-T*; a quantidade em ng de produto de PCR purificado a ser utilizado foi calculada considerando a fórmula (1) abaixo.

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{taxa molar inserto: vetor} \quad (1)$$

O volume total da reação foi 10 µl. A taxa molar inserto:vetor utilizada foi de 3:1. A reação foi incubada a 4°C *overnight* para a obtenção de uma maior eficiência de ligação.

4.4.7 Produção de células competentes

Células competentes de *Escherichia coli* DH5α foram preparadas quimicamente utilizando o método de transformação com PEG (polietilenoglicol). Células de uma colônia isolada de *E. coli*, crescidas anteriormente em placa de Petri contendo meio Luria Bertani – LB (Tryptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,25%; ágar 4%), foram inoculadas em 5 ml de meio TYM líquido (Tryptona 2%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,58%, MgSO₄ 0,25%), o qual foi incubado a 37°C por 16 horas, sob agitação constante de 200 rpm (New Brunswick Scientific – *C24 Incubator Shaker*, Edison NJ, USA). Após o crescimento da cultura, 100 µl foram adicionados a 10 ml de meio TYM líquido para a reinoculação, mantendo-se o frasco incubado a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm, até atingir uma absorbância de 0,2 a 0,6 a 600 nm. Em seguida todo esse volume foi transferido para outro frasco contendo 40 ml de meio TYM e aguardado o crescimento bacteriano nas mesmas condições até o atingir absorbância de 0,5 a 0,9 a 600 nm . Novamente todo o volume foi vertido em outro frasco contendo 200 ml de meio TYM, e manteve-se nas mesmas condições

de crescimento até ser alcançada absorvância de 0,6 a 600 nm. Em seguida o frasco foi colocado rapidamente em gelo e transferido para a centrífuga onde as células foram centrifugadas a 4200 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 ml da solução TBF1 (KOAc 0,03 M, MnCl₂ 0,05 M, KCl 0,10 M, CaCl₂ 0,01 M e Glicerol 15%) gelada e esterilizada em filtro no qual as células foram ressuspendidas. Realizou-se outra centrifugação a 4.200 rpm, por 8 minutos a 4°C. As células foram então gentilmente ressuspendidas em solução TBF2 (MOPS 0,01 M pH 7, CaCl₂ 0,075 M, KCl 0,01 M, Glicerol 15%) gelada e autoclavada. Alíquotas de 100 µl foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80°C.

4.4.8 Transformação bacteriana

O produto da reação de ligação foi inserido nas células de *E.coli* DH5α através do método descrito a seguir. Cinco µl do produto de ligação foram misturados a 20 µl de Tampão de Transformação (KCl 1 M, CaCl₂ 0,3 M e MgCl₂ 0,5 M; 1,5 ml PEG 10% e completado com água) esterilizado em filtro. Em seguida, a mistura foi adicionada a 100 µl de células competentes, homogeneizada suavemente com auxílio de micropipeta e incubada no gelo por 30 minutos. O microtubo foi retirado do gelo e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 400 µl de meio líquido LB à mistura, que foi incubada por 1 hora a 37°C sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram crescidas em placas de Petri contendo meio LB sólido (4% ágar), acrescido de ampicilina e X-Gal (todos em concentração final de 100 µg.ml⁻¹) e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.4.9 Lise de células bacterianas em TE

Colônias transformadas (brancas) de *E. coli* foram selecionadas aleatoriamente e repicadas, com auxílio de palitos esterilizados, para placa de 96 poços contendo 50 µl de TE (Tris-HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5 M) em cada poço. Para rompimento das células e liberação do DNA na solução, as placas foram aquecidas a 96°C em termociclador modelo *GeneAmp*

PCR System 9700 (Life Technologies) durante 10 minutos. As placas contendo o DNA extraído foram mantidas a -20°C até posterior utilização.

4.4.10 PCR de inserto e purificação

Para as reações de amplificação da região do vetor contendo o inserto do gene 16S rRNA do táxon específico, foram utilizados os *primers* M13f (5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3') e M13r (5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAG G 3') (HUEY; HALL, 1989). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para PCR 1X, MgCl_2 1,5 mM, dNTP 0,1 mM; 1U de Platinum® Taq Polimerase (Life Technologies), 5 pmol dos *primers* M13f e M13r; 1 μl da amostra de DNA extraído das colônias e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 μl . As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Life Technologies) nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 5 μl do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) corado com *GelRedTM* (Biotium Inc.) (1,5 $\mu\text{l}/50$ ml de gel) em tampão TSB (BRODY; KERN, 2004), utilizando como padrão molecular 2 μl de 100 pb *DNA Ladder* (Life Technologies). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 minutos e posteriormente foto-documentado.

Após a verificação da amplificação, os produtos de PCR foram purificados adicionando 3 partes de Isopropanol 100% e 1 parte de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada ao produto. A mistura foi agitada levemente no vortex e incubada a -20°C *overnight*. Após o tempo de incubação, centrifugou-se a mistura a 4.000 rpm por 90 minutos, à temperatura ambiente (Centrífuga modelo 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sob papel absorvente, a 900 rpm por 30 segundos. Foi adicionado 150 μl de etanol 70% e centrifugou-se a 4.000 rpm, por 90 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sobre papel absorvente, a 900 rpm por 30 segundos. As amostras foram secas em termociclador a 40°C por 10 minutos e ressuspendidas em água ultrapura (Milli-Q) esterilizada.

4.4.11 PCR de sequenciamento e precipitação

A reação de sequenciamento foi preparada em microplaca 96-well, utilizando o Kit *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies) e os *primers* M13f e M13r, separadamente). A amplificação foi feita em solução contendo: 2,0 µl de *BigDye*; tampão para PCR 1X (Tris-HCl 160 mM pH 9,0; MgCl₂ 4 mM); *primer* 5 pmol; 1 µl do produto de amplificação da região do inserto; e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 10 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Life Technologies) nas seguintes condições: 25 ciclos com desnaturação de 95°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

Após a reação, as amostras foram precipitadas para o sequenciamento conforme instrução do fabricante. Adicionou-se 2 µl de solução Acetato de Sódio (3 M)/EDTA (125 mM) e 60 µl de etanol absoluto. O material foi misturado em vortex e centrifugado a 4.000 rpm, por 45 minutos à temperatura ambiente (Centrifuga modelo 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sobre papel absorvente, a 900 rpm por 30 segundos. Foram adicionados 150 µl de etanol 70% e centrifugou-se a 4.000 rpm, por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida, sobre papel absorvente, a 900 rpm por 30 segundos. As amostras foram secas em termociclador a 40°C por 10 minutos.

As amostras foram ressuspendidas em 10 µl de Hi-Di Formamide (Life Technologies) e analisadas no equipamento *ABI PRISM 3130-XL Genetic Analyzer* (Life Technologies).

4.4.12 Análise das sequências

A verificação das sequências foi realizada com base nos eletroferogramas gerados pelo software *Sequencing Analysis 3.0* (Life Technologies). Através da utilização dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) foram montadas sequências consenso para cada clone unindo as sequências geradas pelos *primers forward* e *reverse* com o qual cada inserto foi sequenciado. Também foi realizada a seleção das melhores sequências, removendo as

bases com baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi qualidade Phred acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas). Em seguida todas as sequências consenso foram submetidas à ferramenta *SeqMatch* do site RDP (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) (COLE et al., 2009), que retornou as espécies mais possivelmente relacionadas com a sequência analisada.

4.5 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR)

As análises de PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) foram realizadas para quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA universal de *Bacteria* e dos táxons específicos determinados neste trabalho nas amostras coletadas. As reações foram realizadas no equipamento *StepOnePlus*[®] (Life Technologies), utilizando o sistema *SYBR Green*.

4.5.1 Pré-amplificação das amostras

O DNA extraído de todas as amostras foi submetido primeiramente a um passo de pré-amplificação por 10 ciclos em termociclador com os *primers* universais fD1 e rD1 para *Bacteria* (Tabela 2). Esse passo foi importante para aumentar proporcionalmente o número de cópias do gene 16S rRNA (cerca de 2⁸ vezes) de todos os táxons específicos a serem analisados facilitando a detecção por qPCR caso existissem em quantidades muito pequenas nas amostras, como proposto por Gonzales, Portillo e Saiz-Jimenez (2005).

Para isso cada réplica de extração foi diluída a 20 ng e um *bulk* de DNA de cada amostra foi criado juntando volumes iguais de cada réplica diluída. Em seguida 1 µl de cada *bulk* de DNA de cada amostra foi adicionado individualmente às reações totais de 50 µl contendo tampão de PCR 1X, dNTPs 100 µM, MgCl₂ 1,5 mM, 1,25 U de Taq DNA Polimerase, 5 pmol de cada *primer* e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. As reações foram realizadas em termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Life Technologies) nas seguintes condições: 96°C por 4 minutos, 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

A quantidade teórica de fragmentos formada nesta etapa de pré-amplificação foi descontada do resultado final das quantificações de qPCR.

4.5.2 PCR quantitativo para o gene 16S rRNA universal de *Bacteria*

A reação de qPCR foi realizada no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies) em solução contendo 5 µl do kit *SYBR Green ROX qPCR* (Fermentas), 2,5 pmol de cada *primer* (U968 – 5' CGA ACG AGA ACC TTA C 3' e R1387 – 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997), 1 µl do DNA pré-amplificado e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µl. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 20 segundos e 72°C por 45 segundos com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 56°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7°C. Em todas as reações foi incluído controle negativo, usando água como molde em vez de DNA. Para cada amostra e para a curva padrão foram feitas triplicatas (réplicas técnicas).

Para construir a curva padrão, utilizou-se o DNA de um isolado da DSMZ (*Burkholderia vietnamiensis* DSM-11319) extraído no laboratório previamente a este trabalho que foi amplificado com os *primers* descritos acima. O produto de PCR (aproximadamente 400 pb) foi purificado e quantificado com o espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies) e diluições seriadas contendo de 10^{10} a 10^2 cópias do fragmento foram feitas.

4.5.3 PCR quantitativo para o gene 16S rRNA táxon-específico

A reação de qPCR foi realizada no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies) em solução contendo 5 µl do kit *SYBR Green ROX qPCR* (Fermentas), 2,5 pmol de cada *primer* sendo um de táxon-específico desenhado neste trabalho (Tabela 10) e outro universal de *Bacteria* (Tabela 2), 1 µl do DNA pré-amplificado e água

ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 μ l. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95°C por 10 minutos, seguido de 60 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento de acordo com o determinado pelos testes para cada conjunto de *primers* (tópico 4.4.4 *Ajustes para amplificação em reação de PCR para checagem dos primers*) por 20 segundos e 72°C por 45 segundos com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, mesma temperatura de anelamento do ciclo anterior por 1 minuto e 95°C por 15 segundos com leitura de dados a cada 0,7°C. Em todas as reações foi incluído controle negativo, usando água como molde em vez de DNA. Para cada amostra e para a curva padrão foram feitas triplicatas (réplicas técnicas).

Para construir as curvas padrões, utilizou-se o DNA de isolados obtidos como descrito pelo tópico 4.4.3 *Extração de DNA de isolados* que foram amplificados com os mesmos *primers* utilizados nos experimentos de qPCR. O produto de PCR foi purificado e quantificado com o espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies) e diluições seriadas contendo de 10^{10} a 10^0 cópias do fragmento foram feitas.

4.5.4 Relação com Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

O número de cópias do gene 16S rRNA encontrado por qPCR foi relacionado com o número de células de bactérias totais e táxon-específicas presentes nas amostras utilizando a média do número de cópias do gene 16S rRNA por genoma de cada microrganismo. Essa informação foi obtida pelo site *rrnDB - the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database* (<http://rrndb.mmg.msu.edu/>) (KLAPPENBACH et al., 2001; LEE; BUSSEMA; SCHMIDT, 2009). O resultado estimado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) presentes em miligramas (mg) ou mililitros (ml) das amostras coletadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta de amostras e extração de DNA

As amostras da primeira coleta (MEL, BH20, MST, PC, VINHO, BT, BD e BCEN) e da segunda coleta (2MEL, 2BH20, 2MST, 2PC, 2PCT, 2VINHO, 2BT, 2BD e 2BCEN) realizadas nos períodos especificados foram armazenadas em -80°C até serem submetidas à extração do DNA total. Foram realizados três procedimentos de extração para cada amostra coletada (trélicas).

5.2 Análises de T-RFLP

5.2.1 Análise de sequências *in silico* para definição de uso das enzimas de restrição

Nas análises procurou-se encontrar enzimas que produzissem o maior número de T-RFs possíveis capazes de distinguir cada uma das 23 sequências do gene 16S rRNA selecionadas (21 espécies representadas por uma sequência cada mais *Lactobacillus plantarum* contendo duas sequências) e T-RFs com comprimento dentro da faixa detectável pelos equipamentos e reagentes utilizados. Quando sistemas de eletroforese capilar são utilizados, uma leitura precisa de fragmentos maiores (de até 1000 pb) pode ocorrer (MARSH et al., 2000). O padrão interno de comprimento utilizado, *GeneScanTM – 500 ROXTM Size Standard* (Life Technologies) possui fragmentos de 35 a 500 pb. Assim a faixa ótima de detecção adotada para as análises compreendeu o intervalo entre 30 a no máximo 650 pb.

A Tabela 3 apresenta a avaliação das enzimas de restrição utilizadas para as análises.

Tabela 3 – Avaliação das enzimas de restrição analisadas nos experimentos *in silico*.

Enzima	Número de fragmentos gerados	Número de fragmentos únicos	Número de fragmentos entre 30 e 650 pb
<i>AluI</i>	13	7	13 (100) ^(a)
<i>BstUI</i>	12	6	12 (100)
<i>DdeI</i>	2	1	1 (50)
<i>EcoRI</i>	15	10	3 (20)
<i>HaeIII</i>	15	9	15 (100)
<i>HhaI</i>	14	8	13 (93)
<i>HindIII</i>	17	13	0 (0)
<i>HinfI</i>	14	7	14 (100)
<i>MseI</i>	14	9	14 (100)
<i>MspI</i>	15	10	15 (100)
<i>RsaI</i>	14	10	8 (57)
<i>TaqI</i>	4	2	4 (100)

^(a)O número entre parênteses se refere à porcentagem do total de fragmentos nessas condições.

Foram selecionadas para os experimentos apenas as enzimas que apresentavam a totalidade dos fragmentos (100%) gerados dentro da faixa detectável estipulada. Apenas as enzimas *AluI* (Fermentas), *BstUI* (Fermentas), *HaeIII* (Fermentas), *HinfI* (Promega), *MseI* (Biolabs), *MspI* (Fermentas) e *TaqI* (Fermentas) se enquadraram neste caso. A enzima *TaqI* não foi selecionada devido a sua baixa capacidade de geração de fragmentos únicos (2). Todas as outras enzimas selecionadas satisfizeram os critérios estipulados. O Apêndice A apresenta todos os T-RFs gerados por cada enzima para cada sequência analisada, dando suporte à escolha desse grupo de enzimas para realização das análises de T-RFLP.

O número de enzimas de restrição a serem utilizadas em experimentos de T-RFLP é um parâmetro importante quando uma representação acurada da diversidade de uma comunidade microbiana é desejada. Para tanto esse número deve ser empiricamente determinado. Sugere-se que sejam utilizadas de quatro a oito enzimas de restrição para digerir uma simples comunidade. (ENGBRETSON; MOYER, 2003). Os resultados indicaram a possibilidade de uso de seis enzimas.

5.2.2 Índice de diversidade e análise multivariada (PCA)

A estrutura das populações, nas amostras analisadas, pode ser inferida a partir do cálculo dos índices de diversidade, sendo que se uma comunidade for composta por um elevado número de espécies, apresenta uma diversidade elevada. As matrizes geradas com os resultados das análises de T-RFLP foram utilizadas para geração do índice de diversidade de *Shannon*. Esse índice foi calculado para cada enzima utilizada com cada tréplica das amostras da primeira (Tabela 4 e Figura 4) e segunda coleta (Tabela 5 e Figura 5). Amostras com maior diversidade apresentam valores do índice mais altos.

Os resultados encontrados com quase todas as enzimas indicaram uma variação estatisticamente não significativa nos índices de diversidade entre as amostras da primeira coleta. Entretanto as análises com as enzimas *AluI*, *HaeII* e *MspI* sugerem que a amostra de biofilme de água (BH2O) apresenta diversidade da comunidade microbiana ligeiramente mais elevada que todas as outras amostras (o índice de *Shannon* encontrado para *AluI* diferiu significativamente dos índices das outras amostras, segundo os testes estatísticos aplicados) ao contrário de MEL que frequentemente figurou como uma das amostras com menor índice de diversidade. Isso sugere que no momento da primeira coleta provavelmente a água esteja sendo fonte da maior variedade de bactérias para o processo fermentativo.

Em relação às amostras da segunda coleta maiores índices podem ser observados em geral nas amostras de MEL e MST. No momento da segunda coleta provavelmente o melão se destaca como possível maior fonte de variedade de contaminantes para o processo, diferentemente da ocasião da primeira coleta. O mosto a ser fermentado é formado pela união entre o melão e água. Portanto é esperado que a composição da comunidade microbiana encontrada nesta amostra seja diretamente influenciada pela das outras duas (as únicas fontes de entrada no sistema). Os outros pontos do sistema raramente apresentaram índices com variação tão significativa entre si considerando a maioria das enzimas.

Tabela 4 – Valores do índice de diversidade de *Shannon* encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da primeira coleta.

Amostras	<i>AluI</i>	<i>BstUI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MseI</i>	<i>MspI</i>
MEL	2,18±0,16ab	1,74±0,18a	2,06±0,26a	2,59±0,09a	2,11±0,28a	2,15±0,10a
BH20	3,12±0,73b	2,27±0,79a	3,01±0,27a	2,45±0,63a	2,60±0,35a	3,03±0,64a
MST	2,65±0,47ab	2,56±0,18a	2,32±0,53a	2,91±0,17a	2,63±0,33a	2,27±0,15a
PC	2,32±0,43ab	1,99±0,87a	2,27±0,23a	2,32±0,17a	2,46±0,42a	2,12±0,30a
VINHO	2,20±0,13ab	2,60±0,32a	2,04±0,14a	2,32±0,33a	2,55±0,58a	2,56±0,39a
BT	2,71±0,21ab	1,74±1,06a	2,42±0,15a	2,68±0,11a	2,68±0,01a	2,17±0,22a
BD	2,06±0,55a	2,77±0,25a	2,20±0,12a	2,14±0,22a	2,48±0,28a	2,26±0,23a
BCEN	2,47±0,81ab	2,51±0,65a	2,08±1,06a	2,68±0,86a	2,29±0,53a	2,32±0,77a

As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Tabela 5 – Valores do índice de diversidade de *Shannon* encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da segunda coleta.

Amostras	<i>AluI</i>	<i>BstUI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MseI</i>	<i>MspI</i>
2MEL	3,88±0,29a	3,81±0,39ab	3,93±0,37a	3,90±0,34a	3,76±0,38a	4,00±0,17a
2BH2O	3,20±0,01bc	3,47±0,07bcd	3,24±0,17b	3,89±0,03a	3,90±0,12a	2,92±0,22c
2MST	3,93±0,13a	3,97±0,14a	4,02±0,11a	3,90±0,10a	3,87±0,15a	4,00±0,02a
2PC	3,08±0,19c	3,09±0,22d	3,92±0,02a	3,18±0,06b	3,18±0,07c	3,88±0,02a
2PCT	3,19±0,18bc	3,25±0,14cd	3,80±0,15a	3,04±0,04b	3,04±0,08c	3,90±0,12a
2VINHO	3,45±0,14b	3,70±0,06ab	4,07±0,04a	3,79±0,07a	3,76±0,07a	3,85±0,07a
2BT	3,15±0,04bc	3,49±0,16bcd	3,93±0,01a	3,33±0,24b	3,33±0,13c	3,85±0,04a
2BD	3,29±0,03bc	3,60±0,04abc	3,91±0,07a	3,38±0,07b	3,36±0,11bc	3,79±0,03a
2BCEN	3,24±0,23bc	3,18±0,11cd	3,10±0,09b	3,13±0,13b	3,72±0,07ab	3,20±0,05b

As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \leq 0,01$).

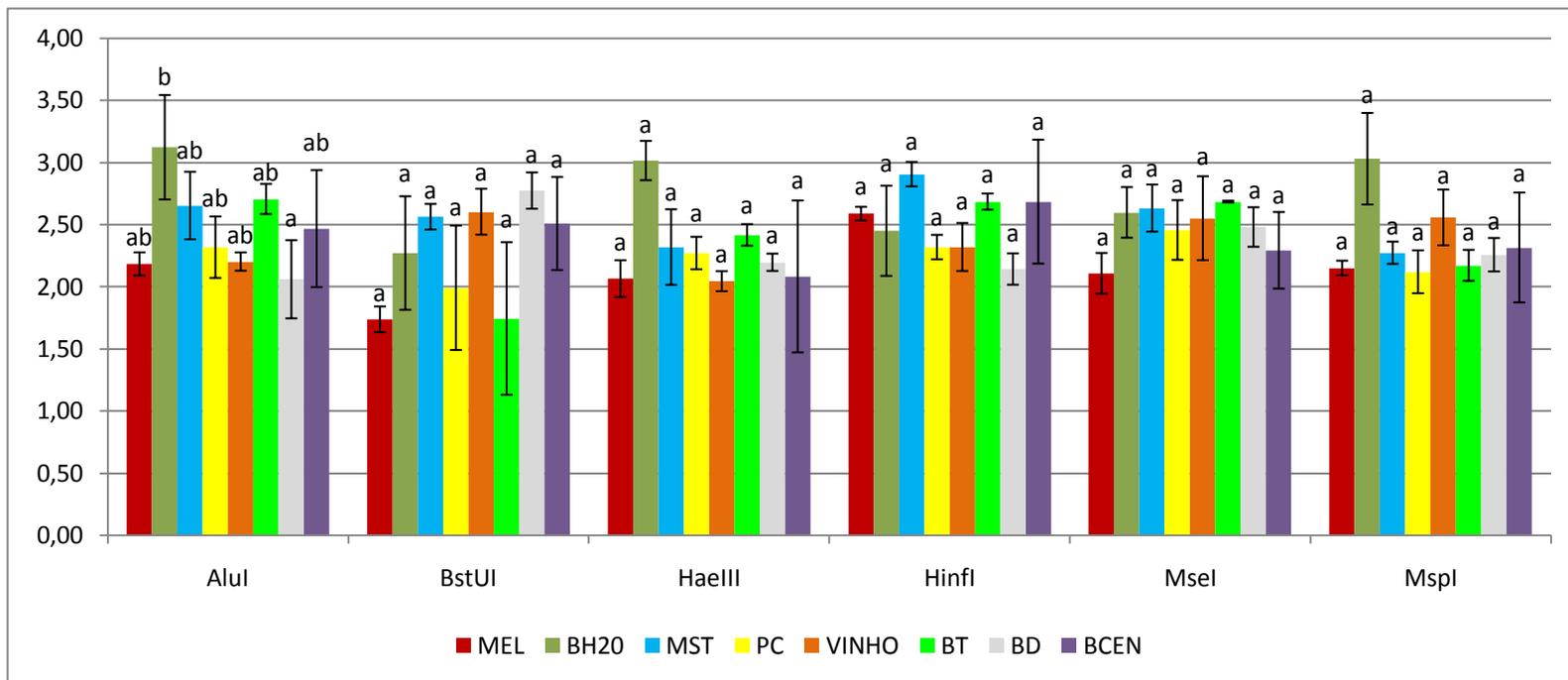


Figura 4 – Representação gráfica dos índices de diversidade de *Shannon* encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da primeira coleta. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

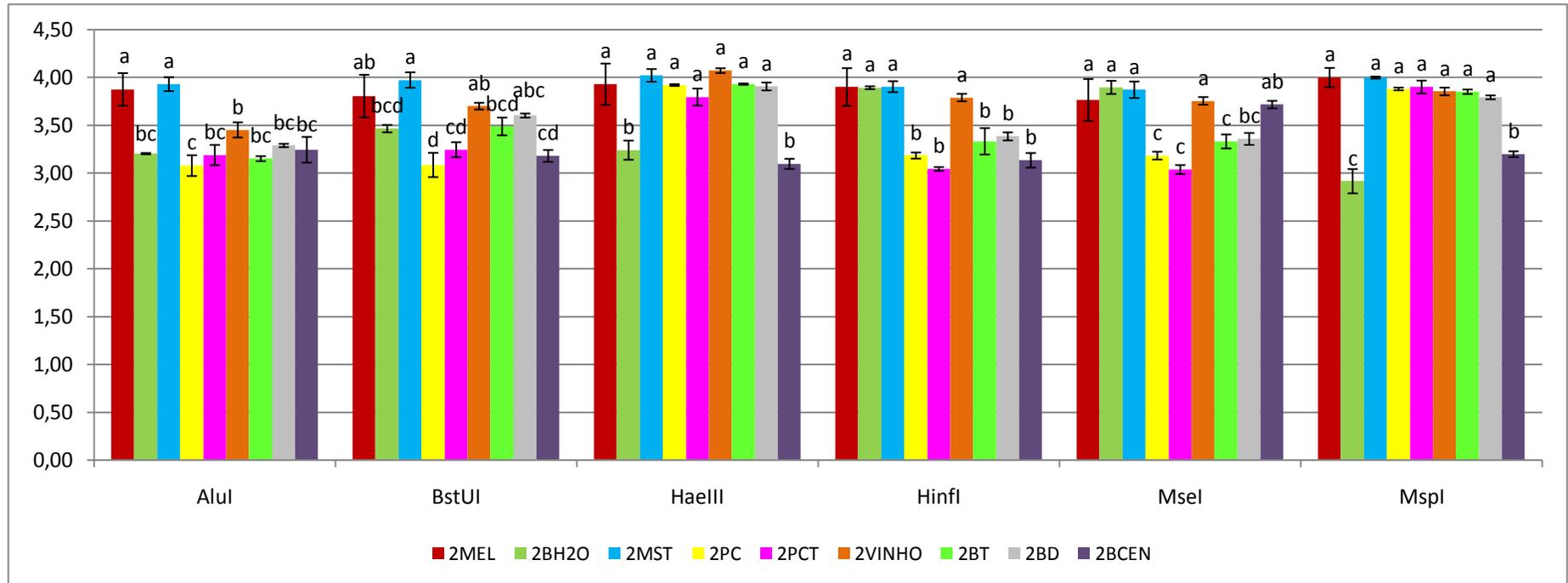


Figura 5 – Representação gráfica dos índices de diversidade de *Shannon* encontrados pela análise dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição em amostras da segunda coleta. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação. Valores nas colunas seguidos de diferentes letras são significativamente diferentes (ANOVA - teste de Tukey, $P \leq 0,01$).

De maneira geral as amostras da segunda coleta apresentaram uma média de índices mais alta (frequentemente acima de 3,0) que as amostras da primeira coleta (frequentemente abaixo de 3,0), sugerindo que a comunidade bacteriana presente no sistema fermentativo no segundo momento de análise apresentava maior variabilidade de espécies. Portanto uma alteração no padrão de contaminação pôde ocorrer de acordo com épocas diferentes. Isso deve estar relacionado a variações em fatores externos ao sistema de fermentação. Angelis (s.d.) sugere que, uma vez que o solo é o grande reservatório microbiológico de micro-organismos, a contaminação que atinge a indústria em sua maior parte tem nele a sua origem. Lima et al. (1974) constataram que as espécies de micro-organismos encontradas na indústria são as mesmas daquelas presentes no solo da lavoura de cana-de-açúcar. Muitos outros fatores interferem na contaminação bacteriana da cana-de-açúcar entre os quais o tipo de colheita, as variedades de cana, as condições climáticas, pragas e doenças, tipos de transporte, condições de armazenamento, o tempo decorrido entre o corte da cana e seu processamento na unidade industrial e o estado da matéria-prima ao dar entrada na usina (ANGELIS, s.d.). A umidade do ar e a temperatura são fatores que também influenciam na quantidade de micro-organismos presentes dentro da indústria (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Todos esses fatores podem variar no decorrer do tempo, influenciando diferencialmente a composição da comunidade bacteriana no sistema fermentativo.

A análise multivariada dos componentes principais (PCA) foi realizada para possibilitar uma demonstração gráfica da relação entre as comunidades bacterianas dos pontos de coleta. As Figuras 6 e 7 apresentam os gráficos encontrados pela utilização de cada uma das 6 enzimas de restrição utilizadas com as amostras das coletas 1 e 2, respectivamente.

Um melhor perfil de agrupamento entre as amostras da primeira coleta pode ser observado pela interpretação dos gráficos de *AluI*, *BstUI*, *HaeIII* e *MseI*. As amostras de biofilme (BD, BT e BCEN), de VINHO e PC estão distribuídas de forma próxima entre si, sugerindo que as comunidades bacterianas ali presentes apresentam composição semelhante. Isto pode sugerir que a principal fonte de manutenção da contaminação bacteriana para o processo fermentativo que ocorre na dorna nesse momento sejam os biofilmes. As amostras de MEL, MST e BH2O estão plotadas mais distantemente no gráfico, indicando possivelmente menor associação com o processo de contaminação. As amostras de MEL e MST apresentam-se muito próximas na área de plotagem dos gráficos devido à composição do mosto (melaço diluído com água).

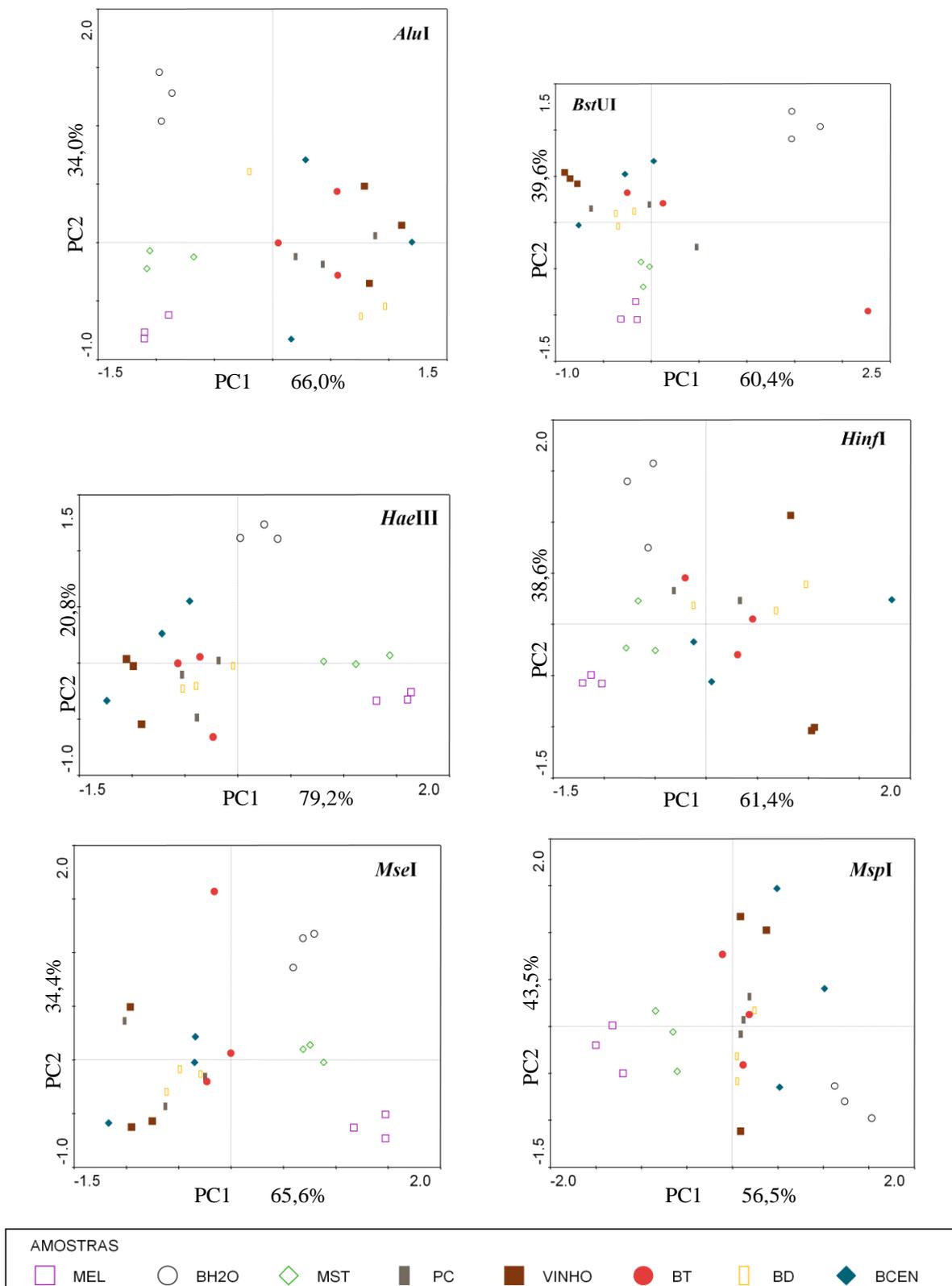


Figura 6 – Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras industriais da primeira coleta determinadas por T-RFLP com as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* e *MspI*. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

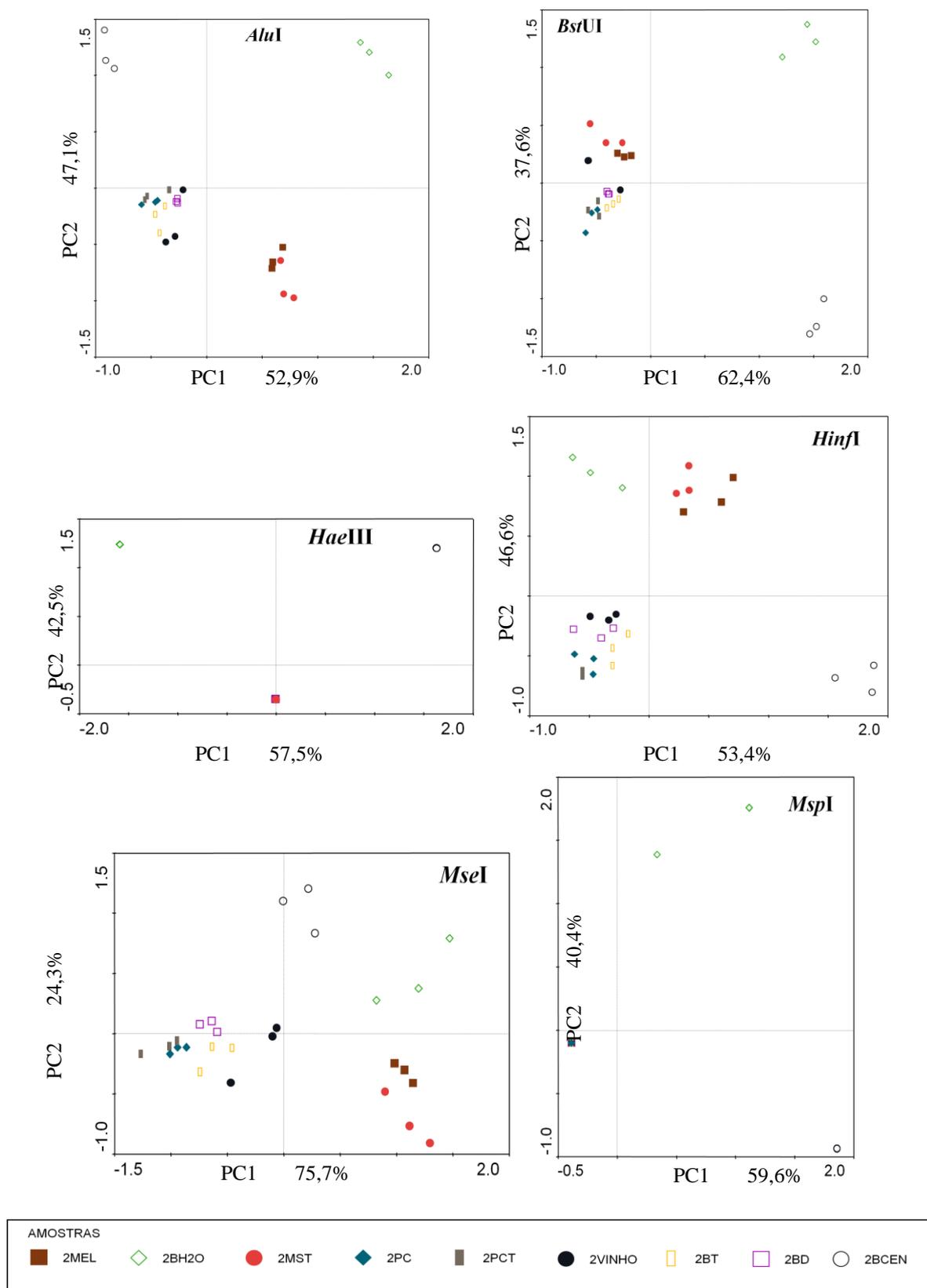


Figura 7 – Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras industriais da segunda coleta determinadas por T-RFLP com as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* e *MspI*. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

Os gráficos de PCA gerados pelas análises das amostras da segunda coleta apresentaram um mesmo padrão de resultado para todas as enzimas utilizadas. As amostras de 2BH2O e 2BCEN apareceram mais distantemente relacionadas com as outras amostras, indicando uma menor semelhança entre suas comunidades bacterianas e as outras. O mesmo aconteceu para o grupo formado pelas amostras de 2MEL e 2MST. O grupo de amostras formado por 2BD, 2BT, 2PC, 2PCT e 2VINHO foram distribuídos proximamente entre si, inferindo maior homogeneidade nas comunidades bacterianas entre essas amostras. Isto sugere mais uma vez a possibilidade dos biofilmes (no caso 2BD e 2BT) estarem servindo como principal fonte de contaminação para o processo fermentativo.

Apesar dos diversos esforços para prevenção da contaminação com extensivos procedimentos de limpeza e desinfecção, biofilmes podem agir como reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos e antissépticos e que continuamente reintroduzem contaminantes no processo (KRAM, 2008; SKINNER; LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007).

Os micro-organismos podem surgir de várias fontes durante o processo de fermentação de etanol em larga escala. Além dos fatores já citados, toda a maquinaria onde ocorre a fermentação e a água utilizada (inclusive o ar em contato com o sistema) são possíveis fontes de contaminação (SCHELL et al., 2007). As tubulações por onde o mosto é transportado também são fontes de infecções (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Assim as comunidades bacterianas do melão e do mosto, apesar de nas duas coletas estarem menos relacionadas com as outras amostras do processo de fermentação, não devem ser isentas da capacidade de servirem como fonte de contaminantes para o processo, pois são as principais fontes de entrada no sistema. O mesmo pode ser inferido para o biofilme de água. A diluição do melão que ocorre antes do processo de fermentação também pode criar condições para o desenvolvimento de micro-organismos que começam a crescer nas condições de pressão osmóticas reduzidas provocadas pela diluição, aumentando o potencial da contaminação (PIGGOT, 2003).

5.2.3 Identificação dos contaminantes

A partir dos resultados obtidos pela técnica de T-RFLP, também foi possível realizar a inferência sobre a composição da comunidade bacteriana presente em cada amostra. Com os eletroferogramas obtidos, foram geradas tabelas de dados que foram analisadas por algoritmos do site *The Microbial Community Analysis MiCA 3 (Microbial Community Analysis III) Phylogenetic Analysis of T-RFLP (PAT+)* (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>) (SHYU et al., 2007). Os resultados obtidos foram analisados em *Excel* (Microsoft) para cruzamento dos dados entre as seis enzimas utilizadas, gerando tabelas com os possíveis contaminantes presentes nas amostras. Apenas espécies que apresentaram geração de picos com as seis enzimas utilizadas foram consideradas para identificação como possíveis contaminantes.

Cada amostra contou com três réplicas de extração, que foram analisadas separadamente. A tabela final da composição de gêneros/espécies de cada amostra foi obtida unindo (somando) as informações de cada réplica.

A Figura 8 apresenta o resultado do número total de gêneros e espécies identificados nas amostras da primeira e segunda coleta.

Dentre as amostras da primeira coleta, BH2O foi a que apresentou maior riqueza de gêneros e espécies, corroborando com os resultados encontrados pela análise da diversidade das amostras através dos T-RFs gerados por cada enzima de restrição, sendo que esta amostra frequentemente apresentou os maiores índices encontrados como já discutido. Provavelmente a principal fonte de variedades de micro-organismos para o processo neste momento tenha sido mesmo a água. As amostras de BT e BD não apresentaram tanta variedade, abrigando possivelmente somente os gêneros com maior capacidade de sobreviverem às condições do processo fermentativo. BCEN é a amostra de biofilme com maior quantidade de espécies presentes, e se destaca como contínuo reintegrador de bactérias contaminantes. VINHO contou com uma variedade grande de espécies provavelmente herdadas da água inserida no processo. Não necessariamente todas as espécies registradas na amostra de VINHO foram capazes de sobreviver às condições do processo de fermentação. T-RFLP é uma técnica molecular baseada em análises independentes de cultivo. Análises baseadas no uso de DNA não permitem distinguir células vivas de mortas (GIRAFFA; CARMINATI, 2008; QUIGLEY et al., 2011).

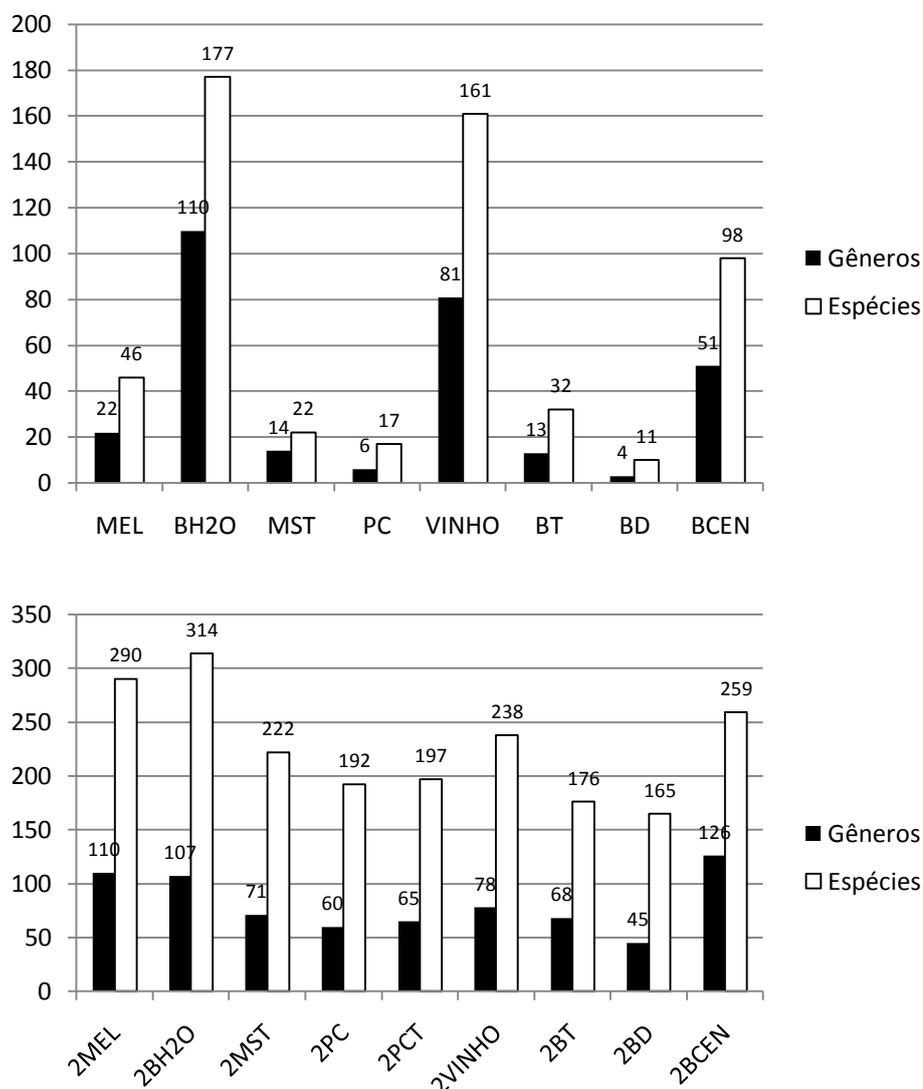


Figura 8 – Número total de gêneros e espécies identificados pela concatenação dos resultados das seis enzimas utilizadas no T-RFLP em amostras da primeira e segunda coleta. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

O número total de espécies encontradas entre as amostras da segunda coleta é bem maior que o número encontrado entre as amostras da primeira coleta, o que indica mais uma vez que a comunidade microbiana de contaminantes neste segundo momento foi maior e mais diversificada; esta variação depende diretamente dos fatores ambientais que ocorrem ao redor da usina como já discutido. As condições peculiares de cada etapa do processo da indústria selecionam determinadas espécies e linhagens de micro-organismos que são favorecidos por tais condições e que não são problemas em outros momentos (CHERUBIN, 2003). Dentre as amostras, 2MEL e 2MST se destacam pelo alto valor de riqueza de espécies sendo as

principais fontes de contaminantes, juntamente com 2BH2O. Entre as amostras da primeira coleta, melão e mosto não haviam se destacado com grande fonte de variação de espécies. 2BCEN, dentre as amostras de biofilme, é a que abriga maior variedade de espécies mantendo a possibilidade de recontaminar as amostras do processo assim como já ocorrido entre as amostras da primeira coleta. As amostras 2PC e 2PCT não apresentaram diferença significativa no número total de espécies que as compõe; como a identificação é baseada na utilização de DNA, não foi possível diferenciar o número de bactérias vivas e mortas entre essas duas amostras. De qualquer maneira não deve ser descartada a hipótese de que tratamento com H₂SO₄ realizado pela usina nas leveduras de reciclo não esteja sendo capaz de exterminar as bactérias presentes.

Os resultados geraram um número muito grande de espécies possivelmente presentes entre as amostras nunca antes registrados. Possíveis variações intragenômicas do gene 16S rRNA podem gerar superestimação da diversidade de espécies num microbioma, não necessariamente refletindo a real estrutura da comunidade (PEI et al., 2010). Devido a isso, em alguns casos o gene 16S rRNA não é sempre considerado a melhor escolha para diferenciação e identificação de linhagens devido a sua natureza altamente conservada intra-espécies e entre linhagens próximas (MUTHAIYAN; RICKE, 2010). A técnica de T-RFLP também pode oferecer desvantagens que culminam na superestimação da diversidade microbiana, tais como: digestão incompleta dos fragmentos amplificados e formação de pseudo T-RFs derivados da amplificação de produtos de DNA de fita única (FELSKE; OSBORN, 2005); a amplificação de DNA fragmentado pode gerar artefatos de PCR, tais como quimeras (LIESACK; WEYLAND; STACKEBRANDT, 1991). As armadilhas geradas pela amplificação por PCR incluem inibição da reação por contaminantes co-extraídos, amplificação diferencial (LUEDERS; FRIEDRICH, 2003), formação de artefatos de PCR (OSBORNE et al., 2005) e vieses associados à heterogeneidade do operon *rrn* (FARELLY; RAINEY; STACKEBRANDT, 1995).

Devido a isso, optou-se por prosseguir com a análise da inferência filogenética dos contaminantes evidenciando os gêneros, o que deve fornecer resultados com maior grau de confiabilidade e precisão.

A Tabela 6 apresenta o resultado da identificação dos principais gêneros e espécies encontrados por análise de T-RFLP das amostras da primeira coleta.

Tabela 6 – Principais gêneros e espécies identificados por análises de T-RFLP de amostras da primeira coleta.

Gênero/Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Acetobacter</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acetobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Alicyclobacillus</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	3
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	5
<i>Bacillus akibai</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	3
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Bacillus clausii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillus halodurans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus pumilus</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	3
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	5
<i>Bacillus stratosphericus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Bacillus tianmuensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Burkholderia</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia gladioli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia glumae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia multivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia tropica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia unamae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia xenovorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus asini</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus avium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1

(continua)

(continuação)

Gênero/Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus mundtii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Halomonas</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	7
<i>Halomonas salina</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Halomonas sp.</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	7
<i>Halomonas variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Lactobacillus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	7
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus buchneri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus capillatus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus crustorum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus farciminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	4
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	6
<i>Lactobacillus kefirii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	5
<i>Lactobacillus kisonensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	6
<i>Lactobacillus mobilis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus mucosae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus nantensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	4
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	5
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	3
<i>Lactobacillus rapi</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	3
<i>Lactobacillus reuteri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Lactobacillus similis</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	3
<i>Lactobacillus sp.</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	7
<i>Lactobacillus sp. rennanqilfy</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	4
<i>Lactobacillus sunkii</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	4
<i>Lactococcus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	4

(continua)

Gênero/Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	4
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Lactococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pediococcus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Pediococcus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Staphylococcus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus equinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus phocae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus sobrinus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Weissella</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	2
<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	2

+: gênero/espécie presente; -: gênero/espécie ausente. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

Foram destacados os gêneros mais relevantes retratados na literatura como contaminantes frequentes do processo de fermentação alcoólica. Entre eles: *Acetobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Weissella*. *Burkholderia* e *Pseudomonas*, apesar de não serem reportados comumente como contaminantes já foram encontrados em resultados de análises anteriores a este trabalho em nossos laboratórios por isso também foram evidenciados. O gênero *Alicyclobacillus* foi destacado nas análises devido à frequente ocorrência de contaminação na indústria de bebidas fermentadas (LAWLOR, 2006). Não há registros conhecidos da ocorrência de espécies do gênero *Halomonas* em sistemas fermentativos, mas a frequência de sua presença foi relevante entre as amostras analisadas. O Apêndice B contém a relação

completa de outros possíveis contaminantes não comuns encontrados nas amostras da primeira coleta.

Uma classificação dos principais gêneros de acordo com a frequência de aparecimento de suas espécies foi gerada (Tabela 7).

Tabela 7 – Resumo dos principais gêneros encontrados nas amostras da primeira coleta classificados pela frequência de aparecimento das espécies relacionadas.

Gênero	Amostras da primeira coleta								Amostras	Frequência
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	totais	total
									ocorrentes	(espécies)
<i>Lactobacillus</i>	4	-	3	12	31	14	8	10	7	82
<i>Bacillus</i>	10	1	5	-	4	-	-	4	5	24
<i>Burkholderia</i>	-	13	-	-	-	-	-	-	1	13
<i>Halomonas</i>	1	1	-	1	2	1	1	4	7	11
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	3	-	-	7	2	10
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	7	-	-	-	1	7
<i>Lactococcus</i>	-	-	-	1	1	1	-	4	4	7
<i>Pediococcus</i>	3	-	3	-	-	-	-	-	2	6
<i>Alicyclobacillus</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	3	3
<i>Staphylococcus</i>	2	-	1	-	-	-	-	-	2	3
<i>Acetobacter</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	1	2
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	1	-	-	1	2	2
<i>Weissella</i>	-	-	1	-	1	-	-	-	2	2

As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

O gênero *Lactobacillus* aparece com a maior frequência de espécies contaminantes em praticamente todas as amostras. Dentre todas as espécies encontradas as desse gênero são as mais comuns também já registradas predominantemente em outros trabalhos através do uso de cultura microbiológica (GALLO, 1990; OLIVA-NETO, 1990; RODINI, 1985; ROSALES, 1989; SILVA, 1988) e procedimentos moleculares (LUCENA et al., 2010;). Também predominam em dornas de fermentação de milho (SKINNER; LEATHERS, 2004) principalmente em amostras de biofilme (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007) já que são capazes de secretar exopolissacarídeos que as confere proteção (HAMMES; HERTEL, 2009). De acordo com Heist (2009) e Lushia e Heist (2007) *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* juntamente com *Lactobacillus* entre outros formam o grupo das bactérias gram-positivas que produzem ácido lático a partir de glicose e figuram como os principais e mais frequentes contaminantes de processos fermentativos. Isso devido a sua

capacidade de sobreviver em ambientes anaeróbios, tolerar altas temperaturas (30°C – 45°C) e baixo pH e pela habilidade de crescer rapidamente e sobreviver num ambiente de produção de etanol (NARENDRANATH, 2003). Além disso, *Lactobacillus* é o principal gênero com espécies que estimulam a floculação da levedura (principalmente *Lactobacillus fermentum*) interferindo negativamente no rendimento do processo de produção do etanol (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001; OLIVA-NETO, 1990).

Espécies de *Pediococcus* apareceram nas amostras de MEL e MST e não perduraram no sistema durante a ocorrência da fermentação ao contrário do observado por Gallo (1990). Também não foram encontradas em amostras de biofilme apesar de sua presença já ter sido detectada em amostras de biofilme provenientes do processo de fermentação do milho (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATERS, 2007).

Espécies de *Leuconostoc* não foram identificadas entre as amostras da primeira coleta, apesar de aparecerem frequentemente em amostras de melaço (PIGGOT, 2003) e já terem sido detectadas em caldo de cana preparado para fermentação (SILVA, 1988) e em vinho (RODINI, 1985). Compreende espécies capazes de produzirem goma dextrana utilizando o açúcar do meio, como *Leuconostoc mesenteroides* (CULLIMORE, 2000); a produção de goma é um fator que pode provocar a adesão de células de leveduras provocando a floculação, interferindo no rendimento do processo fermentativo. *Leuconostoc* também já foi detectado em amostras de biofilme provenientes do processo de fermentação do milho (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATERS, 2007).

O gênero *Weissella* contou apenas com o aparecimento de *Weissella paramesenteroides* em amostras de VINHO provavelmente oriundas da sua presença em MST. Lucena (2010) também encontrou essa mesma espécie de *Weissella* em seus resultados em amostras de usinas brasileiras assim como Skinner e Leathers (2004) em amostras de processo fermentativo a partir do milho.

Espécies do gênero *Streptococcus* são anaeróbios facultativos e também contém espécies produtoras de ácido lático (CULLIMORE, 2000) que podem ser encontradas em sistemas de produção de etanol (GALLO, 1990). A presença na amostra de VINHO implica possível competição com levedura na utilização do açúcar, provavelmente ajudando a diminuir o rendimento do processo. BCEN deve estar servindo de fonte de contaminação para a dorna de fermentação.

Lactococcus também contém espécies que produzem ácido láctico a partir de glicose e já foram detectadas em processos de fermentação a partir do milho (SKINNER; LEATHERS, 2004) estando presentes em amostras de biofilme (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007). A produção de exopolissacarídeos é muito comum entre espécies desse gênero (TEUBER, 2009), portanto é previsto que possam constituir amostras de biofilmes. *Lactococcus* foi encontrado em amostras de BT e BCEN que podem estar servindo de fonte de contaminação para VINHO e PC.

Enterococcus é também outro grupo produtor de ácido láctico. Suas espécies frequentemente são encontradas no trato intestinal de animais e humanos e podem adentrar no processo de produção de etanol através da água principalmente (HEIST, 2009). *Enterococcus* foi detectado em amostra de VINHO e pode estar competindo com levedura por fonte de nutrientes.

Espécies de *Bacillus* também são frequentemente retratadas como contaminantes de processos fermentativos (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; GALLO, 1990; RODINI, 1985; ROSALES, 1989; SILVA, 1988). Dentre as amostras da primeira coleta, espécies de *Bacillus* foram encontradas em MEL e MST que provavelmente estão servindo de fonte para a contaminação de VINHO. *Bacillus* são organismos gram-positivos frequentemente oriundos do solo; são geralmente esporulantes e termófilos capazes de suportarem condições extremas (LOGAN; VOS, 2009) como as encontradas no processo de produção de açúcar que gera o melaço utilizado para fermentação. Também foram constatados em BH2O e BCEN provavelmente constituindo parte da comunidade microbiótica desses biofilmes funcionando como fonte de contaminação. Dentre as amostras da primeira coleta, *Bacillus* foi um dos gêneros mais representativos e que aparece num grande número de amostras, confirmando seu destaque entre os micro-organismos contaminantes. *Bacillus* é capaz de competir com a levedura pelo açúcar do meio, pois utiliza a sacarose para produção de levânio assim como também espécies de *Streptococcus*, além de ajudar a estimular a floculação, o que resulta em queda no rendimento da produção do álcool (SERRA et al., 1979).

Staphylococcus compreende espécies gram-positivas facultamente anaeróbias e o seu principal produto da fermentação da glicose é o ácido láctico. Quando em condições aeróbias produz ácido acético e crescem na presença de 10% de NaCl (CULLIMORE, 2000). Foram identificadas em trabalhos anteriores como contaminantes da produção do etanol (GALLO, 1990; SILVA, 1988). São oriundas do ambiente como ar, água, solo, areia e poeira, portanto

podem facilmente penetrar no sistema fermentativo. Nas amostras da primeira coleta foram detectadas apenas em MEL e MST, portanto sua presença dentre os contaminantes neste instante provém de fontes externas, mas não foram detectadas em amostras no momento da ocorrência da fermentação.

Bactérias gram-negativas tais como do gênero *Acetobacter* apesar de sobreviverem em condições ácidas e utilizarem o etanol para produção de ácido acético não são capazes de crescerem na ausência de oxigênio. No entanto a faixa ótima de temperatura para crescimento está entre 15 e 34°C (ANGELIS, s.d.), sendo que teores alcoólicos inferiores a 11% favorecem suas atuações (RIZZON, 2006). De qualquer maneira espécies desse gênero não devem conseguir se desenvolver nas dornas onde ocorre a fermentação em condições anaeróbias, mas o ácido acético produzido por *Acetobacter* em outros pontos do processo pode interferir no metabolismo da levedura diminuindo sua eficiência. Frequentemente *Acetobacter* pode ser encontrado nos tanques de multiplicação da levedura de reciclo onde ocorre aeração para estimular a multiplicação das leveduras (HEIST, 2009; NARENDRANATH, 2003). Representantes contaminantes já foram encontrados também por Rosales (1989). De acordo com Sievers e Swings (2005) são comuns em alimentos fermentados e podem causar infecções em vinho, saquê, tequila, cidra, cerveja e outros fermentados. *Acetobacter* foi encontrado em amostra de BH2O e não foi detectado em nenhum outro ponto do sistema.

Rosales (1988) registra relato de espécies do gênero *Pseudomonas* em processo fermentativo. Espécies representantes desse táxon também foram encontradas em amostras de destilarias em trabalhos anteriores não publicados desenvolvidos pelo mesmo grupo de estudo deste trabalho através de sequenciamento do gene 16S rRNA. Os organismos desse gênero são versáteis metabolicamente, capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos simples ou complexos. Conseqüentemente eles estão distribuídos por solos e água, sendo importantes como patógenos de plantas, animais e humanos (ZAGO; DE-POLLI; RUMJANEK, 2000). Gram-negativas, são estritamente aeróbicas e a maioria das espécies não é capaz de crescer sob condições ácidas (pH 4,5 ou menor) e sobrevivem preferencialmente de 28°C a no máximo 45°C, não oferecendo risco para a produção do etanol. Entre as amostras da primeira coleta, *Pseudomonas* foi detectado em VINHO possivelmente BCEN sendo a fonte de contaminação provavelmente não danosa.

Não há na literatura relatos de espécies de *Burkholderia* presentes em amostras provindas de usinas produtoras de etanol. Em trabalhos anteriores não publicados de sequenciamento do gene 16S rRNA desenvolvidos pelo grupo de trabalho do Laboratório de Biologia Celular e Molecular CENA/USP, espécies de *Burkholderia* foram frequentemente registradas. Neste trabalho, foi constatada a presença de espécies desse gênero apenas em amostra de BH2O, provavelmente devido a espécies desse táxon ocorrerem frequentemente em água e também em solo, plantas, insetos e humanos (COENYE; VANDAMME, 2003). Mesmo presentes não há registros de causas de danos para a produção do etanol.

Parish (2006), Tribst, Sant'Ana e de Massaguer (2009) relatam diversos trabalhos onde *Alicyclobacillus* tem sido retratado como um gênero frequentemente contaminante de em sucos, bebidas, solo, superfície de frutas e água de reciclo entre outros produtos alimentícios que apresentam baixo pH. Esses organismos são gram-positivos, esporulantes sob condições aeróbicas ou facultativas a 45°C e pH 3,0 (e em alguns casos em condições anaeróbicas também) e termotolerantes-termofílicos que podem sobreviver à pasteurização e a tratamentos com alto aquecimento (BERKELEY; ALI 1994; PARISH, 2006). Inicialmente tratados como pertencentes ao grupo *Bacillus*, mereceram reclassificação como um novo gênero devido a suas características peculiares (WISOTZKEY et al., 1992). O suco obtido da cana-de-açúcar apresenta pH ideal para o desenvolvimento de organismos (SINGH et al. 2008), entre eles possivelmente espécies de *Alicyclobacillus*. Devido a essa possibilidade de contaminação e às características de sobrevivência desse gênero, é possível que ele esteja presente em amostras de melaço provindas da produção do açúcar a partir da cana-de-açúcar, concordando com o registro do aparecimento de *Alicyclobacillus* em amostras de MEL e MST e conseqüentemente em VINHO entre as amostras da primeira coleta. Não há registros que comprovam que espécies de *Alicyclobacillus* possam disputar por nutrientes com as leveduras, nem que sejam capazes de diminuir o rendimento da produção do etanol. No entanto o aparecimento desse gênero em melaço sugere que o processo de produção de açúcar na usina examinada não está eliminando contaminantes que podem se tornar um problema para a indústria alimentícia.

Assim como espécies de *Lactobacillus*, espécies de *Halomonas* foram detectadas em praticamente todas as amostras da primeira coleta exceto em MST. *Halomonas* é um grupo formado por espécies halofílicas moderadas encontradas em ambientes hipersalinos. Entre elas é comum a produção de exopolissacarídeos extremamente resistentes a temperatura, pressão, salinidade e acidez (BOUCHOTROCH et al., 2000). Em seu trabalho Poli et al.

(2009) descreveram pela primeira vez *Halomonas* sp. como excelente produtora do polissacarídeo levânio a partir da utilização principalmente de sacarose entre outros açúcares. Enzimas sintetizadas por organismos produtores de levânio clivam a sacarose e acoplam moléculas de frutose para formar o polissacarídeo que também pode ser composto por traços de glicose. Levânio é um polissacarídeo fortemente adesivo e capaz de formar filmes de biopolímero estáveis ao calor e a ambientes ácidos e alcalinos (KANG et al., 2009). Kucukasik et al. (2011) demonstraram que é possível que ocorra a produção de levânio por *Halomonas* através da utilização da sacarose presente no melaço proveniente do processamento de beterraba ou milho em condições otimizadas. Portanto, é extremamente relevante o registro da presença desse gênero em amostras de processos fermentativos, pois para a geração do levânio pode haver o consumo da sacarose disponível para fermentação gerando etanol. A produção do exopolissacarídeo por *Halomonas* também possibilita a formação de biofilmes resistentes que protegem os micro-organismos e podem funcionar como fonte de contaminação constante de espécies desse gênero para o sistema. A presença do levânio pode também estimular a floculação do levedo.

De maneira geral houve a predominância de espécies de *Lactobacillus* e *Bacillus* entre as amostras da primeira coleta, assim como encontrado por Gallo (1990), Silva (1998) e Rodini (1985) evidenciando a relevância desses dois gêneros na contaminação de processos fermentativos mesmo em condições de alto rendimento de produção de etanol (16%). Lucena et al. (2010) também já haviam destacado a capacidade de espécies do gênero *Lactobacillus* serem capazes de crescerem em meio contendo níveis de etanol acima de 10%. Ainda assim espécies desses dois gêneros aparecem associadas com biofilmes, o que possibilita uma frequente reintrodução dessas espécies no meio fermentativo para competição por nutrientes com a levedura.

Os gêneros *Halomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Pseudomonas* foram detectados em amostras de biofilme e em amostras líquidas figurando como os principais contaminantes provindos de biofilme no momento da primeira coleta. Dentre os gêneros destacados entre os contaminantes da primeira coleta, Stewart, Mukherjee e Ghannoum (2004) apresentam *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* como micro-organismos que apresentam suscetibilidade antimicrobiana reduzida através de formação de biofilmes.

Pediococcus, *Alicyclobacillus*, *Staphylococcus* e *Weissella* formam o grupo de contaminantes provindos de fontes externas entre elas melão, mosto e biofilme de água.

Enterococcus foi registrado apenas em amostra de vinho, não sendo possível detectar qual a fonte de contaminação das espécies desse gênero neste momento.

Acetobacter e *Burkholderia* foram detectados apenas em BH2O e, apesar de *Acetobacter* ser um contaminante frequente não apareceu em outras amostras do sistema não oferecendo ameaça para o processo fermentativo

A Tabela 8 apresenta o resultado dos principais contaminantes encontrados pela análise das amostras da segunda coleta, destacando os mesmo gêneros destacados nas análises das amostras da primeira coleta. Pelos mesmos motivos e para efeito de comparação os mesmos gêneros evidenciados nos resultados da análise das amostras da primeira coleta foram destacados entre os resultados das amostras da segunda coleta. A relação completa dos possíveis contaminantes das amostras da segunda coleta pode ser encontrada no Apêndice C.

Tabela 8 - Principais gêneros e espécies identificados por análises de T-RFLP de amostras da segunda coleta.

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Acetobacter</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Acetobacter estunensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Alicyclobacillus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus ferripilum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+	5
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9

(continua)

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus acidicola</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Bacillus ainingensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Bacillus akibai</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus alcalophilus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus algicola</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus anthracis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Bacillus aquimaris</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillus badius</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Bacillus baekryungensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus beijingensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus caldolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus caldotenax</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus cereus biovar anthracis</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	-	4
<i>Bacillus cereus subsp. cytotoxis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus circulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus clausii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus coagulans</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5
<i>Bacillus endophyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus firmus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus flexus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus gibsonii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus ginsengi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus hackensackii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus horikoshii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus isronensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus koreensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus lehensis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	7
<i>Bacillus lentus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus macroides</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus mannanilyticus</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Bacillus massiliensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus methanolicus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus mojavensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus nealsonii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8

(continua)

(continuação)

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Bacillus oleronius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus psychrodurans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus samanii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus senegalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus simplex</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus smithii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Bacillus thuringiensis serovar finitimus</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	5
<i>Bacillus thuringiensis serovar konkukian</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	5
<i>Bacillus tipchiralis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	3
<i>Bacillus vortex</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Burkholderia</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia ambifaria</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia ferrariae</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia fungorum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	4
<i>Burkholderia gladioli</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia glumae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia lata</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia mallei</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Burkholderia multivorans</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia phymatum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Burkholderia sartisoli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Burkholderia silvatlantica</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia sp.</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia thailandensis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia tropica</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia unamae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia xenovorans</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Enterococcus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Enterococcus asini</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	3

(continua)

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Enterococcus dispar</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	3
<i>Enterococcus durans</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Enterococcus faecium</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Enterococcus mundtii</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	7
<i>Halomonas</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Halomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus crispatus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Lactobacillus ingluviei</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Lactobacillus kefir</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus kisonensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus mucosae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus nantensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Lactobacillus rapi</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus reuteri</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus rhammosus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus sunkii</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactococcus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus garvieae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus piscium</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	6
<i>Lactococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Pediococcus</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
<i>Pediococcus cellicola</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3
<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1

(continua)

(continuação)

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2
<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas corrugata</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas flavescens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas fulva</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas graminis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas indica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas japonica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas jessenii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas lini</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas lurida</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas lutea</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas migulae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas otitidis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas poae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas synxantha</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas trivialis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas veronii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus arlettae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus carnosus subsp. carnosus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus carnosus subsp. utilis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus condimentii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus croceolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus equorum subsp. equorum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7

(continua)

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus pseudolugdunensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Streptococcus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus cristatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dentapri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dentirosetti</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus didelphis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus downei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgal</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus equinus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus ferus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallol</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>macedo</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus iniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus macacae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Streptococcus mitis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus orisuis</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	4
<i>Streptococcus parauberis</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	4
<i>Streptococcus phocae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus pyogenes</i> str <i>Manfredo</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1

(continua)

(conclusão)

Gênero/Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Streptococcus sobrinus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus sp.</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	4
<i>Streptococcus uberis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus ursoris</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	5
<i>Weissella</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6
<i>Weissella confusa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6
<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Weissella sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1

+: gênero/espécie presente; -: gênero/espécie ausente. As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

Uma classificação dos principais gêneros de acordo com a frequência de aparecimento de suas espécies foi gerada (Tabela 9).

Tabela 9 – Resumo dos principais gêneros encontrados nas amostras da segunda coleta classificados pela frequência de aparecimento das espécies relacionadas.

Gênero	Amostras da segunda coleta									Amostras	Frequência
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	totais	total
										ocorrentes	(espécies)
<i>Bacillus</i>	53	53	50	48	48	49	16	46	38	9	401
<i>Streptococcus</i>	24	24	24	21	22	31	23	23	8	9	200
<i>Lactobacillus</i>	19	7	19	18	18	20	18	18	10	9	147
<i>Staphylococcus</i>	16	17	16	16	16	16	-	16	-	7	113
<i>Burkholderia</i>	21	21	13	-	-	-	19	-	17	5	91
<i>Alicyclobacillus</i>	12	13	3	4	3	3	11	3	12	9	64
<i>Pseudomonas</i>	1	33	1	1	1	1	2	1	2	9	43
<i>Lactococcus</i>	5	4	5	5	5	6	5	4	-	8	39
<i>Enterococcus</i>	3	-	3	5	3	5	4	3	3	8	29
<i>Weissella</i>	1	-	1	3	3	4	3	3	3	8	21
<i>Acetobacter</i>	2	2	2	2	2	2	-	2	2	8	16
<i>Pediococcus</i>	3	-	1	3	2	-	-	-	2	5	11
<i>Halomonas</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1

As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

Em concordância com o já indicado pelos resultados das outras análises, as amostras da segunda coleta apresentaram uma configuração mais homogênea na distribuição dos

contaminantes identificados. Praticamente todos os gêneros destacados foram detectados em todas as amostras de biofilmes e amostras líquidas. Isso indica que nesse momento a comunidade microbiana presente nos biofilmes continua reintroduzindo contaminantes de todos os tipos no processo. Skinner-Nemec, Nichols e Leathers (2007) também constataram em seu trabalho que os contaminantes podem persistir nas instalações de produção de etanol em biofilmes que são resistentes a limpeza e ao uso de antibióticos. Apenas o gênero *Halomonas* não foi detectado em amostras de biofilme, mas ainda está presente em 2VINHO provavelmente disputando por nutrientes com as leveduras. 2MEL, diferentemente do melão da primeira coleta, se destaca uma fonte de grande quantidade de micro-organismos. Muitos desses não são capazes de sobreviverem ao processo de geração do melão, mas podem ter se juntado a ele através de possíveis outras fontes de contaminação não analisadas neste trabalho. Narendranath (2003) e Schell (2007) destacam os tanques de armazenagem e as linhas de transferência como possíveis fornecedoras de contaminantes, entre outras. 2BH2O também continua em evidência como fonte de contaminantes. Em consequência 2MST também apresentou alta variedade de possíveis espécies presentes.

Bacillus neste momento se destacou como o principal contaminante e novamente gêneros com espécies produtoras de ácido láctico como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* despontam entre os mais frequentes entre as amostras. *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*, gêneros também produtores de ácido láctico a partir da utilização de glicose, apareceram com maior frequência nesta segunda coleta. Espécies de *Enterococcus* e *Weissella* passaram a fazer parte da comunidade presente em biofilmes juntamente com *Pediococcus* que novamente não apareceu em amostras provenientes da dorna de fermentação.

Espécies de *Acetobacter* foram detectadas em todas as amostras menos em 2BT. Mesmo em condições anaeróbias nas quais *Acetobacter* não é capaz de se desenvolver, sua detecção pode ter ocorrido devido à presença de seu material genético nas amostras.

Burkholderia foi mais uma vez detectado e não foi capaz de se desenvolver em vinho, mas mantém-se presente entre as amostras de biofilme. *Alicyclobacillus* e *Pseudomonas*, outros dois gêneros que assim como *Burkholderia* provavelmente não oferecem ameaça reconhecida para a produção de etanol, foram encontrados em todas as amostras. Mais estudos são necessários para analisarem se a presença de alguns desses gêneros tem algum impacto para o rendimento do processo fermentativo.

Leuconostoc mais uma vez não foi encontrado em nenhuma amostra não se revelando um gênero problemático no sistema da usina avaliada.

Os micro-organismos na indústria se distribuem desigualmente podendo haver uma variação quantitativa (densidade de células) e qualitativa (composição da comunidade microbiana) ao longo do tempo e espaço (MAUKONEN et al., 2003), o que pode explicar as diferenças observadas entre as amostras da primeira e segunda coleta. Mudanças no ecossistema afetam diretamente o crescimento bacteriano e são as principais causas dessas mudanças (GIRAFFA; NEVIANI, 2001).

5.2.4 Avaliação de capacidade quantitativa da técnica de T-RFLP

As informações obtidas pelas análises de T-RFLP até então foram apenas qualitativas. Porém um perfil quantitativo dos contaminantes de processos fornece informações importantes para a indústria.

A capacidade quantitativa da técnica de T-RFLP foi verificada através de experimentos com amostras de dois isolados e duas amostras industriais escolhidas aleatoriamente, de identificação e composições quaisquer. Foi possível avaliar se a alteração na quantidade de fragmentos do gene 16S rRNA purificados gerados por PCR (25 ng, 50 ng, 100 ng, 125 ng e 150 ng) e utilizados para a digestão com enzimas de restrição escolhidas aleatoriamente (*AluI* e *HaeIII*) era proporcional a alteração dos picos de fluorescência gerados nos eletroferogramas.

A Figura 9 apresenta a comparação entre os eletroferogramas obtidos com as análises dos dois isolados. Pode ser observado um aumento na intensidade dos picos de fluorescência proporcional ao aumento da quantidade de fragmento do gene 16S rRNA utilizado para digestão. Apenas o isolado 1 quando digerido com a enzima *HaeIII* apresentou pico de fluorescência mais alto quando utilizado 25ng de DNA do que quando utilizado 50 ng.

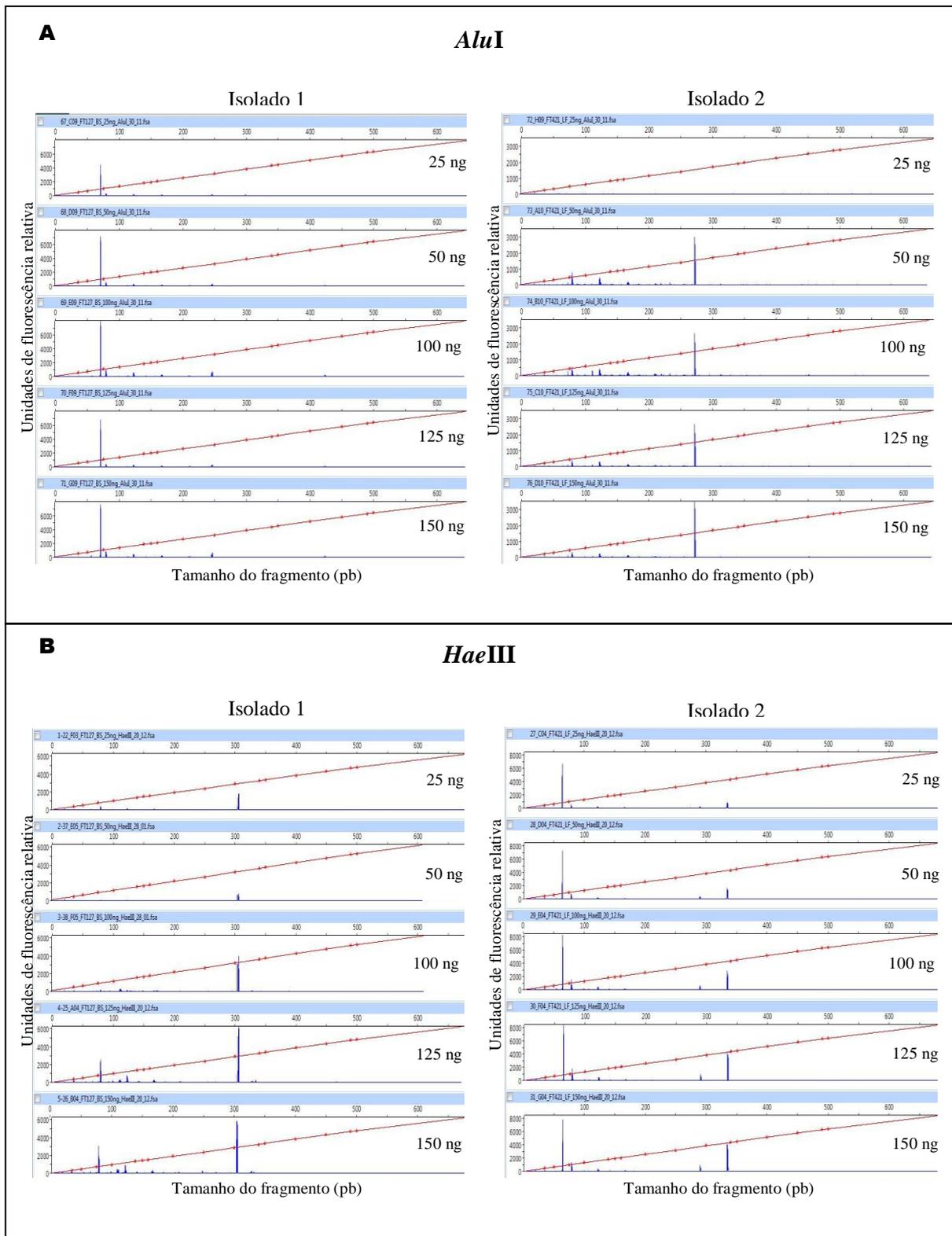


Figura 9 – Eletroferogramas gerados pelos T-RFLPs dos isolados 1 e 2 utilizando 25 ng, 50 ng, 100 ng, 125 ng e 150 ng de fragmento do gene 16S rRNA purificado para digestão com as enzimas de restrição *AluI* (A) e *HaeIII* (B).

Quando se observa os eletroferogramas gerados pelas análises com as duas amostras industriais (Figura 10) não se encontra uma proporção segura entre os picos de fluorescência gerados e as quantidades de DNA utilizadas para a digestão. Amostras industriais frequentemente apresentam vários picos nos gráficos de T-RFLP, possivelmente relacionados às diferentes bactérias presentes. A relação de proporcionalidade entre os picos de uma mesma amostra (abundância relativa) não se mantém de acordo com a alteração na quantidade de DNA utilizado. Em algumas situações um pico apresenta menor intensidade que outro, mas em outra situação essa dominância se inverte (Figura 10, A, amostra industrial 2, 50 ng e 100 ng; Figura 10, B, amostra industrial 1, 50 ng e 25 ng). Esse resultado foi observado independentemente da amostra e da enzima utilizada.

De acordo com os resultados encontrados, não foi possível garantir que a técnica de T-RFLP fosse capaz de gerar qualquer tipo de informação quantitativa ou semi-quantitativa precisa de amostras provenientes de usinas. Foi verificado que quando ocorre a presença de várias espécies na amostra a concentração de fragmentos de DNA utilizados para a digestão pode interferir diretamente na variação da emissão de fluorescência dos fragmentos gerados por cada espécie e pode não refletir a verdadeira proporção original entre eles.

Trotha et al. (2002) apresentaram aprimoramentos da técnica de T-RFLP para possibilitar a quantificação de micro-organismos presentes em amostras. Sánchez et al. (2006) conseguiram resultados semi-quantitativos válidos com essa técnica quando analisadas amostras de fermentação láctica contendo apenas duas espécies presentes. Mas nenhum desses trabalhos avaliou a diferença nas quantidades de fragmentos de DNA utilizados para a digestão. Todos os autores também concordam com a limitação da técnica de T-RFLP para caracterização quantitativa quando analisadas comunidades desconhecidas, muito diversificadas ou provenientes de ecossistemas complexos, como é possivelmente o caso deste estudo.

Sendo assim, procedeu-se com desenhos de *primers* específicos para serem utilizados na quantificação dos contaminantes já identificados através da técnica de PCR quantitativo.

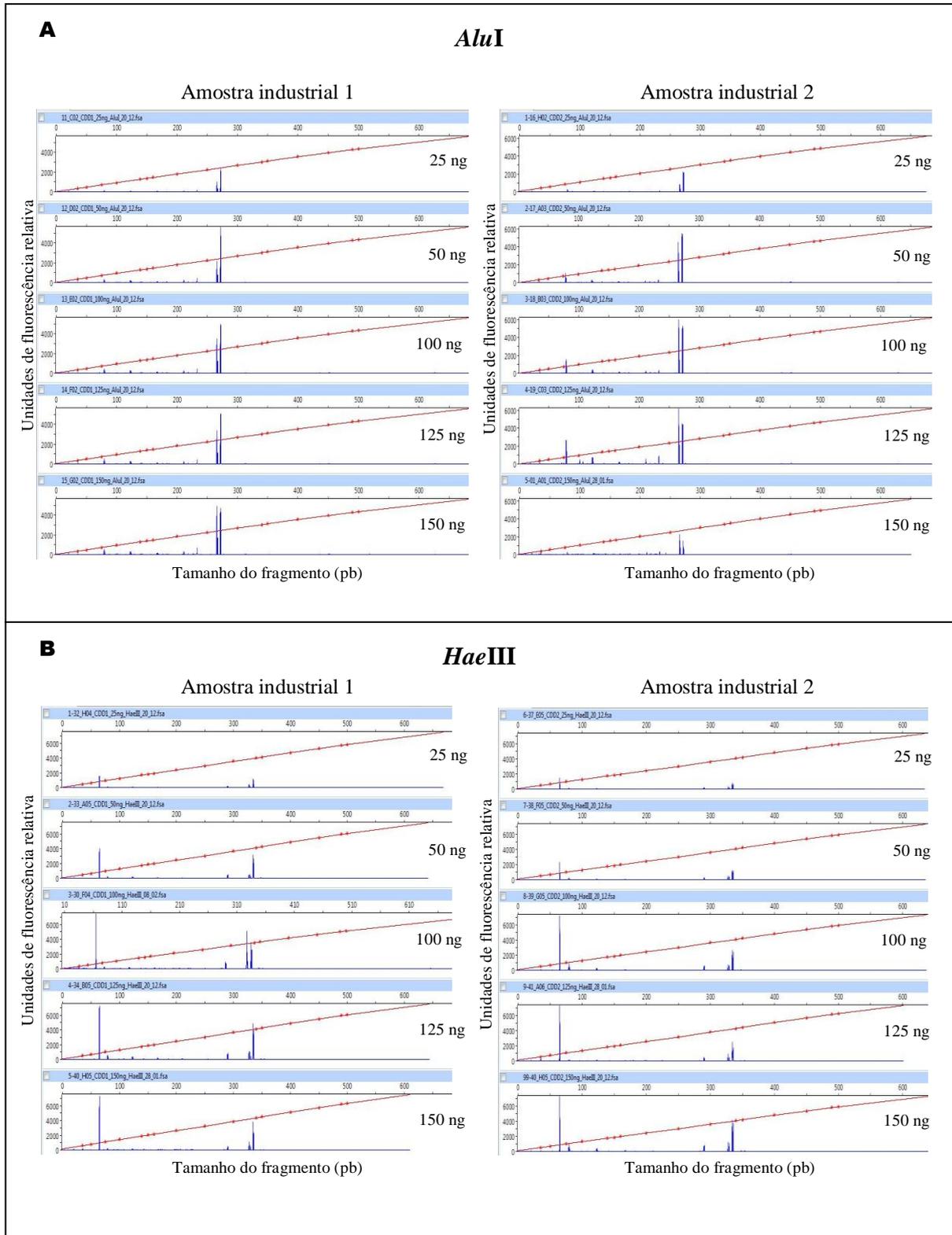


Figura 10 – Eletroferogramas gerados pelos T-RFLPs das amostras industriais 1 e 2 utilizando 25 ng, 50 ng, 100 ng, 125 ng e 150 ng de fragmento do gene 16S rRNA purificado para digestão com as enzimas de restrição *AluI* (A) e *HaeIII* (B).

5.3 Desenvolvimento e testes de *primers* para utilização em qPCR

5.3.1 Desenho, análise e seleção dos *primers*

Na literatura há diversos relatos de *primers* desenhados para o gene 16S rRNA utilizados para ampliações de alguns dos táxons específicos alvo desta pesquisa. A maioria dos registros se refere ao desenvolvimento e/ou uso de *primers* específicos para organismos provenientes de uma variedade de ambientes não relacionados com o processo de produção de etanol, como para *Lactobacillus* encontrados no intestino humano e produtos lácticos (HEILIG et al., 2002; KWON et al. 2004), na produção de queijo (RANDAZZO et al, 2002) e também provenientes do ecossistema bucal (BYUN et al., 2004; QUEVEDO et al., 2011); para isolados de *Leuconostoc* extraídos de *kimchi* (produto vegetal fermentado comum na Coreia) (JANG et al., 2003); para isolados de bactérias produtoras de ácido acético tais como as do gênero *Acetobacter* provenientes da produção do vinho para consumo humano e vinagre (TORIJA et al., 2010); para espécies de *Bacillus* (BLACKWOOD; OAKS; BUYER, 2005) em alguns casos pertencentes apenas ao grupo de *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis*) (BAVYKIN et al., 2004); para isolados de *Streptococcus* da cavidade oral (QUEVEDO et al., 2011); para diferenciar espécies de *Lactococcus* e *Enterococcus* de outras bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de produtos derivados do leite, e do organismo e fezes do homem e de outros animais (DEASY et al., 2000). No entanto os *primers* encontrados desta maneira não eram inteiramente homólogos a todas as sequências das espécies dos táxons alvos obtidas pela identificação dos contaminantes das presentes amostras com a técnica de T-RFLP, impedindo o seu uso para esse caso. Desta forma, procurou-se desenhar *primers* gênero-específicos considerando o englobamento de todas as sequências encontradas dos táxons alvo. Esses *primers* seriam utilizados nos experimentos seguintes de quantificação por qPCR e para isso era importante que todas as espécies encontradas (ou a maior parte delas) fossem consideradas para o desenho para viabilizar uma quantificação precisa e completa de cada gênero. Morales e Holben (2009) sugerem que sempre devem ser gerados novos conjuntos de *primers* específicos para quantificação por qPCR a partir de sequências do gene 16S rRNA de espécies presentes nas amostras a serem estudadas, como é o caso.

No total foram desenhadas duas sequências de *primers* homólogas às sequências do gene 16S rRNA das espécies bacterianas encontradas na primeira coleta que compunham cada um dos principais gêneros destacados no resultado da identificação dos contaminantes (*Acetobacter*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Halomonas*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*). Para *Lactobacillus* foram desenhadas três sequências. O gênero *Leuconostoc* mesmo não tendo aparecido nos resultados das análises também foi considerado para o desenho de *primers* devido à frequência de sua ocorrência em processos fermentativos como reportado por trabalhos já citados. A região escolhida para o desenho foi a que apresentava maior conservação dentre as espécies de interesse. Para o desenho dos *primers* de *Leuconostoc* utilizou-se as sequências das espécies desse gênero utilizadas para as análises *in silico* (Tabela 1).

Os testes de amplificação foram realizados utilizando um dos *primers* gênero-específico desenhado juntamente com um *primer* universal de *Bacteria* (Tabela 2), exceto para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (nesses casos os testes de amplificação foram realizados utilizando apenas os *primers* desenhados para cada gênero).

A Tabela 10 apresenta todas as sequências de *primers* geradas bem como suas principais características.

Dentre uma extensa lista de oligonucleotídeos gerada pelo programa *Primrose* (ASHELFORD; WEIGHTMAN; FRY, 2002), foram descartados os *primers* que apresentaram incompatibilidade com alguma(s) dentre as sequências alvo, apresentavam baixa TM, e que aparentemente não eram compostos de bases discriminatórias na extremidade 3'. Foram selecionados apenas os que apresentaram menor possibilidade de formação de estruturas secundárias e que apresentaram complementariedade apenas a sequências de espécies do táxon específico para o qual foram desenhados (de acordo com comparação com banco de dados do RDP 10 (COLE et al., 2009)); em poucos casos também foram admitidos *primers* que apresentaram complementariedade com poucas sequências de espécies pertencentes a gêneros que não apareceram nos resultados de T-RFLP.

Tabela 10 – *Primers* gênero-específicos desenhados e suas características principais.

Gênero alvo	Nome do primers ^(a)	Sequencia (5' → 3')	TM (em °C)	Sítio alvo (em <i>E.coli</i>) ^(b)	Primer universal utilizado ^(c)	Tamanho do amplicon (pb)	Estruturas secundárias	Referência
<i>Acetobacter</i>	Acb-582-F	CGTDSMGA CTAGAGTGTGAG	54	643-662	1114-1099r	473	-	Este estudo
	Acb-601-R	CTCACACTCTAGTCKSHACG	54	643-662	341-357f	296	1 dímero	Este estudo
<i>Alicyclobacillus</i>	Alcb-725-F	AAGGCGCCTTGCTGGACAGT	62,3	728-747	1114-1099r	385	1 dímero	Este estudo
	Alcb-750-R	TCAGTCACTGTCCAGCAAGG	57	734-753	341-357f	412	1 dímero	Este estudo
<i>Bacillus</i>	Bcl-943-F	AGTACGGYCGCAAGMCT	56,6	889-905	-	264 ^(d)	1 dímero	Este estudo
	Bcl-1207-R	AATGCTGGCAACTARRAYC	51,6	1117-1135	-		2 dímeros	Este estudo
<i>Burkholderia</i>	Brkh-138-R	CCCYACTMCWGGACAYG	53,1	131-147	fD1	138	-	Este estudo
	Brkh-1432-R	TAGYCACTTCTGGYAAAACCC	54,8	1421-1441	1099-1114f	336	1 dímero	Este estudo
<i>Enterococcus</i>	Entc-1284-R	YTMGCRAC TCGTTGTACTTC	52,8	1243-1262	1099-1114f	162	1 dímero	Este estudo
	Entc-1331-R	CAATCCGA AACTGAGAGAAGC	53,2	1290-1309	1099-1114f	209	-	Este estudo
<i>Halomonas</i>	Hlm-446-R	GCBTTCTCCTCGCTGAAAAG	55,5	436-455	341-357f	114	1 <i>cross</i> -dímero	Este estudo
	Hlm-604-R	GGGCTTTCACAACCGGCKT	60,1	595-613	341-357f	272	1 dímero	Este estudo
<i>Lactobacillus</i>	Lcbc-625-F	ARGTYTGAWGTGAAAGCCYT	53,1	595-614	-	(e)	-	Este estudo
	Lcbc-708-R	GTTCCA CTNYCYTCTTCTG	51,2	659-677	-	(e)	2 <i>cross</i> -dímeros ^(f)	Este estudo
	Lcbc-803-R	ATRCTTTCGARYCTCAGCGT	55,3	753-772	-	(e)	1 <i>cross</i> -dímero ^(f)	Este estudo
<i>Lactococcus</i>	Lccc-1003-F	CGTGCTATTCTAGAGAT	47,7	1001-1017	1114-1099r	113	-	DEASY et al. (2000) ^(g)
	Lccc-1020-R	ATCTCTAGGAATAGCACG	47,7	1001-1017	685-704f	337	-	DEASY et al. (2000) ^(g)
<i>Leuconostoc</i>	Lntc-148-R	ATGTTATCCCCAGCCTTG	51,9	138-155	fD1	148	-	Este estudo
	Lntc-238-R	CGCGGAYCCATCTCTAGG	56	221-238	fD1	238	2 <i>cross</i> -dímeros	Este estudo
<i>Pediococcus</i>	Pdcc-50-F	GCAAGTCGAACGAACTTCCGT	57,9	57-70	357-341r	334	1 dímero	Este estudo
	Pdcc-156-F	CAGAAGYAGGGGATAACACC	53,7	137-156	357-341r	228	-	Este estudo
<i>Pseudomonas</i>	Psdm-110-F	SCTAGGAATCTGCCTRGTRG	54,4	123-142	357-341r	224	-	Este estudo
	Psdm-129-R	CYACYAGGCAGATTCCTAG	51,5	124-142	fD1	129	2 dímeros	Este estudo

(continua)

(conclusão)

Gênero alvo	Nome do primers ^(a)	Sequencia (5' → 3')	TM (em °C)	Sítio alvo (em <i>E.coli</i>) ^(b)	Primer universal utilizado ^(c)	Tamanho do amplicon (pb)	Estruturas secundárias	Referência
<i>Staphylococcus</i>	Stapc-241-R	CRGCGCGGRTCCATCTATA	56,7	223-241	fD1	241	-	Este estudo
	Stapc-1264-R	TTMGCTGCCCTTTGTATTGTC	54,4	1242-1262	1099-1114f	162	-	Este estudo
<i>Streptococcus</i>	Strpc-839-F	GTGCTARGTGTTAGRYCCTT	53	823-842	1114-1099r	295	-	Este estudo
	Strpc-863-R	CACTAARYCCCGAAAGGR	54,8	838-855	685-704f	171	-	Este estudo
<i>Weissella</i>	Wsla-132-R	CCGTTCCGCACTCTTTGY	56,4	97-112	fD1	132	-	Este estudo
	Wsla-179-R	CAARTGTTATCCCCTGCTAAG	52	138-158	fD1	179	-	Este estudo

^(a)Os nomes dos *primers* são acrescidos de “f” e “r” indicando sua posição de anelamento nas fitas do DNA para amplificação, “*forward*” (fita sense) e “*reverse*” (fita anti-sense), respectivamente.

^(b)De acordo com BROSIUS et al. (1978).

^(c)A descrição das características dos *primers* universais utilizados pode ser encontrada na Tabela 2.

^(d)Tamanho do amplicon esperado em amplificação com os *primers* Bcl-943-F e Bcl-1207-R.

^(e)Tamanho do amplicon esperado em amplificação com os *primers* Lcbc-625-F e Lcbc-803-R: 178 pb; Tamanho do amplicon esperado em amplificação com os *primers* Lcbc-625-F e Lcbc-708-R: 83 pb.

^(f)Estrutura(s) formada(s) utilizando *primer* Lcbc-625-F.

^(g)*Primers* modificados de DEASY et al. (2000).

5.3.2 Isolados bacterianos utilizados para teste dos *primers*

Para que fosse possível realizar os testes de especificidade dos *primers* desenhados, diversas cepas de isolados bacterianos foram obtidas através da empresa Fermentec e da Coleção de Microrganismos e Culturas de Células da Alemanha – DSMZ (*German Collection of Microorganism and Cell Cultures* – www.dsmz.de). Foram utilizadas espécies representantes de todos os gêneros para os quais os *primers* foram desenhados, exceto de *Enterococcus* e *Halomonas* devido a problemas na aquisição de isolados (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação de espécies fornecedoras de material genético utilizado para teste com os *primers* desenhados.

Espécie	Código	Fonte
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	FT531	Fermentec
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	DSM 3922	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i>	FT485	Fermentec
<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	FT127	Fermentec
<i>Burkholderia cepacia</i>	DSM 50181	DSMZ
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	DSM 11319	DSMZ
<i>Lactobacillus casei</i>	FT243	Fermentec
<i>Lactobacillus casei</i>	FT382	Fermentec
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	FT260	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT230	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT363	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT391	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT392	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT397	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT402	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT421	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT435	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT491	Fermentec
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT502	Fermentec
<i>Lactobacillus paracasei</i>	FT370	Fermentec

(continua)

(conclusão)

Espécie	Código	Fonte
<i>Lactobacillus paracasei</i>	FT376	Fermentec
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FT025	Fermentec
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FT337	Fermentec
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FT401	Fermentec
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FT530	Fermentec
<i>Lactobacillus sp.</i>	FT383	Fermentec
<i>Lactobacillus sp.</i>	FT494	Fermentec
<i>Lactobacillus zeae</i>	FT290	Fermentec
<i>Lactococcus lactis</i>	FT149	Fermentec
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	FT132	Fermentec
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FT044	Fermentec
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FT122	Fermentec
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 6506	DSMZ
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 6829	DSMZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	FT029	Fermentec
<i>Staphylococcus hyicus hyicus</i>	FT062	Fermentec
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	FT276	Fermentec
<i>Streptococcus agalactiae</i>	FT095	Fermentec
<i>Streptococcus lactis</i>	FT378	Fermentec
<i>Weissella cibaria</i>	FT005	Fermentec

Como pôde ser observado algumas espécies foram representadas com mais de um isolado. Todas as espécies tiveram seu DNA genômico extraído, os quais foram utilizados nas reações de PCR para os testes de especificidade dos *primers*.

5.3.3 Amplificação em PCR para checagem dos *primers* desenhados

Todos os *primers* desenhados foram testados (em conjunto com seus respectivos pares de *primers* universais de *Bacteria*) com os DNAs de espécies representantes de cada gênero.

Durante os testes o objetivo principal foi encontrar as condições ideais de reação (principalmente a temperatura de anelamento ótima) para cada conjunto de *primers* utilizado, visando a geração de amplicon de tamanho previsto apenas em espécies do táxon alvo.

A Tabela 12 apresenta o resultado dos testes realizados entre os conjuntos de *primers* gênero-específicos (Tabela 10) e os DNAs dos isolados (Tabela 11).

Foram completamente descartados os *primers* que promoveram a amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA de espécies representantes do gênero para o qual não foram desenhados. Testes denominados como “não avaliados” se referem a não aplicação do teste com alguma espécie; isso acontecia quando invariavelmente já era detectada amplificação inespecífica com um outro isolado testado previamente e não era possível cessá-la ou quando um dos dois conjuntos desenhados para um gênero específico já apresentava resultado satisfatório não sendo necessário testar o outro.

Os dois conjuntos de *primers* desenvolvidos com especificidade para o gênero *Acetobacter* (Acb-582-F/1114-1099r e 341-357f/Acb-601-R) apresentaram geração de fragmentos do mesmo tamanho esperado para espécies de *Acetobacter* quando testados com espécie de *Streptococcus* (FT378). A alteração de temperatura de anelamento (testes até 65°C e 67°C para cada par de *primer*, respectivamente) não proporcionou um aumento de especificidade nos dois casos; a intensidade da produção de fragmentos de *Acetobacter* diminuiu na mesma proporção que *Streptococcus*.

Os conjuntos de *primers* utilizados para a amplificação de *Alicyclobacillus* Alcb-725-F/1114-1099r e 341-357f/Alcb-750-R não foram capazes de promover a amplificação do gene 16S rRNA apenas da espécie deste gênero. Também ocorreu amplificação do gene de espécie de *Bacillus* (FT127). A alteração na temperatura de anelamento (testes até 69°C) possibilitou a diminuição da intensidade da amplificação a partir de *Bacillus*, mas de *Alicyclobacillus* também na mesma proporção. A alteração na concentração de MgCl₂ utilizado (testes de 1,5 mM a 3 mM) também provocou alteração proporcional entre as amplificações a partir dos dois gêneros. Esses resultados inviabilizaram a utilização de ambos os conjuntos devido à falta de especificidade.

Tabela 12 – Ocorrência de amplificações através de testes de PCR com *primers* gênero-específicos e DNA de isolados representantes de cada gênero.

<i>Primer</i> específico	Gêneros											
	<i>Acetobacter</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Weissella</i>
Acb-582-F	+	na	-	na	na	na	na	na	na	na	+ (FT378)	na
Acb-601-R	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (FT378)	-
Alcb-725-F	-	+	+ (FT127)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcb-750-R	-	+	+ (FT127)	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Bcl-943-F e	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bcl-1207-R												
Brkh-138-R	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Brkh-1432-R	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Entc-1284-R	na	na	na	na	+/' (FT530)	na	na	-	na	na	na	na
Entc-1331-R	na	na	na	na	+/' (FT530)	na	na	-	na	na	na	na
Hlm-446-R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hlm-604-R	na	na	na	na	na	na	na	na	+ (DSM6506)	na	na	na
Lcbc-625-F e	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Lcbc-708-R												
Lcbc-625-F e	na	na	na	na	+	na	+	+	na	na	na	na
Lcbc-803-R												
Lccc-1003-F	-	+'	-	-	+ (FT421)	-	-	-	-	-	-	-
Lccc-1020-R	na	na	na	na	na	-	na	na	-	na	-	na
Lntc-148-R	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Lntc-238-R	na	na	na	na	-	na	+	+	na	na	na	na
Pdcc-50-F	na	na	na	-	-	na	na	-	na	na	na	na
Pdcc-156-F	na	na	na	-	-	na	na	-	na	na	na	na

(continua)

(conclusão)

<i>Primer específico</i>	<i>Gêneros</i>											
	<i>Acetobacter</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Weissella</i>
Psdm-110-F	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
Psdm-129-R	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Stapc-241-R	na	na	+ (FT127)	–	na	na	na	na	na	+	na	na
Stapc-1264-R	–	–	+ (FT127)	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Strpc-839-F	na	na	na	na	na	+ (FT149)	na	na	–	na	–	na
Strpc-863-R	na	na	na	na	na	–	na	na	–	na	–	na
Wsla-132-R	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Wsla-179-R	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+

+: ocorrência de amplificação com tamanho de amplicon esperado; +': ocorrência de amplificação com tamanho de amplicon não esperado; –: não ocorrência de amplificação; na: não avaliado.

A amplificação de fragmentos de 16S rRNA apenas de espécies do gênero *Bacillus* foi alcançada com a utilização do conjunto de *primers* desenhados para esse gênero (Bcl-943-F/Bcl-1207-R). As condições específicas para a PCR estão na Tabela 13.

O teste com o par de *primers* fD1/Brkh-138-R foi específico para a amplificação apenas de espécies de *Burkholderia* dentre as espécies de outros gêneros. As condições ideais para que ocorra a amplificação estão apresentadas na Tabela 13. Devido a isso o outro conjunto de *primers* específico para esse gênero 1099-1114f/Brkh-1432-R não precisou ser testado e avaliado.

Não foi possível realizar os testes dos dois conjuntos de *primers* desenvolvidos para *Enterococcus* (1099-1114f/Entc-1284-R e 1099-1114f/Entc-1331-R) com DNA de espécies desse gênero devido à falta de isolados representantes. De qualquer maneira os dois conjuntos foram testados com outros isolados e promoveram a amplificação de fragmentos de tamanho previsto para *Enterococcus* em espécie de *Lactobacillus* (FT530) gerando também fragmentos inespecíficos de aproximadamente 500 pb desse mesmo isolado. A variação na concentração de MgCl₂ utilizado (1,5 mM a 3 mM) e na temperatura de anelamento (variando até 69°C) não inviabilizou a geração desses fragmentos, o que promoveu o descarte dos dois conjuntos de *primers*.

O gênero *Halomonas* também não contou com espécie representante para o teste dos pares de *primers* 341-357f/Hlm-446-R e 341-357f/Hlm-604-R, mas ainda assim procederam-se os testes com os representantes dos outros gêneros. O conjunto 341-357f/Hlm-446-R a princípio promoveu a amplificação de fragmento de tamanho esperado, mas em espécie do gênero *Pseudomonas*. No entanto a utilização de temperatura de anelamento a 66°C permitiu que isso parasse de ocorrer. O conjunto 341-357f/Hlm-604-R em testes promoveu a geração de fragmentos de tamanho específico em espécie do gênero *Pseudomonas* (DSM6506). O teste com temperaturas mais altas (69°C) apenas diminuiu a intensidade na geração desses fragmentos. Ambos os conjuntos de *primers* para *Halomonas* também foram testados diretamente com DNA de amostras coletadas na usina. Os resultados desses testes estão apresentados no tópico seguinte.

O conjunto de *primers* Lcbc-625-F/Lcbc-708-R desenvolvidos para a amplificação do gene 16S rRNA apenas de espécies de *Lactobacillus* foi também capaz de gerar fragmentos do mesmo tamanho quando utilizados para testes com isolado do gênero *Leuconostoc* (FT044). Quando aumentada a temperatura de anelamento os fragmentos de *Lactobacillus*

diminuíam na mesma intensidade que os de *Leuconostoc*. O conjunto Lcbc-625-F/Lcbc-803-R amplificou trecho de DNA de mesmo tamanho para *Lactobacillus*, *Leuconostoc* (FT044) e *Pediococcus* (FT122) e a variação na temperatura de anelamento utilizada não foi capaz de cessar a amplificação dos gêneros inespecíficos. Portanto não foi possível prosseguir com a utilização com nenhum dos dois conjuntos de *primers* desenhados.

Nenhuma espécie do gênero *Lactococcus* teve fragmentos do gene 16S rRNA amplificados por nenhum dos conjuntos de *primers* (Lccc-1003-F/1114-1099r e 685-704f/Lccc-1020-R) desenvolvidos para essa finalidade, mesmo em condições de baixa estrigência (temperatura de anelamento 53°C). Além disso, os *primers* Lccc-1003-F/1114-1099r apresentaram amplificação de fragmentos de tamanho esperado para *Lactococcus* quando testados com espécies de *Lactobacillus* (FT421), além de permitirem o surgimento de fragmentos inespecíficos de alto peso molecular (>1000 pb) quando testados com DNA de espécie de *Alicyclobacillus*, situações não evitadas com a alteração nas condições das reações. Ambos os conjuntos de *primers* foram ineficientes e não puderam ser aproveitados.

Os dois os conjuntos de *primers* desenhados especificamente para amplificarem o gene 16S rRNA de espécies de *Leuconostoc* (fD1/Lntc-148-R e fD1/Lntc-238-R) possibilitaram a amplificação de fragmentos do mesmo tamanho em espécies de *Pediococcus* (FT122). O aumento gradual da temperatura de anelamento permitiu que todos os fragmentos fossem gerados com menor intensidade até alcançar a completa ausência de amplificação com todos os gêneros a 69°C, incluindo *Leuconostoc*, o que inviabilizou a utilização de qualquer par de *primers* desse gênero para os experimentos de quantificação seguintes.

Não foi possível obter a amplificação de espécies do gênero *Pediococcus* com nenhum dos conjuntos de *primers* desenvolvidos (Pdcc-50-F/357-341r e Pdcc-156-F/357-341r) para essa finalidade mesmo em condições de baixa estrigência (temperatura de anelamento 53°C). Isso impediu a possibilidade de quantificar espécies de *Pediococcus* presentes nas amostras por qPCR através da utilização desses *primers*.

O teste com o par de *primers* Psdm-110-F/357-341r foi específico para a amplificação apenas de espécies de *Pseudomonas* dentre as espécies de todos os gêneros analisados. As condições ideais para a ocorrência da amplificação estão apresentadas na Tabela 13. Devido a isso não foi necessário testar o outro par de *primer* específico para esse gênero, fD1/Psdm-129-R.

Ambos os conjuntos de *primers* desenhados para a amplificação específica de 16S rRNA de espécies de *Staphylococcus* (fD1/Stapc-241-R e 1099-1114f/Stapc-1264-R) também foram capazes de gerar os fragmentos de mesmo tamanho previsto quando testados com espécies de *Bacillus* (FT127). Testes com temperatura de anelamento a até 69°C não possibilitaram o cessamento das amplificações inespecíficas provocando o descarte dos dois conjuntos de *primers*.

Espécies de *Streptococcus* também não foram capazes de terem fragmentos amplificados pelo uso de nenhum dos dois conjuntos de *primers* (Strpc-839-F/1114-1099r e 685-704f/Strpc-863-R) gerados para essa finalidade mesmo utilizando baixas temperaturas de anelamento (53°C). Além disso, o conjunto Strpc-839-F/1114-1099r foi capaz de promover geração de fragmentos de tamanho específico em espécie do gênero *Lactococcus* (FT149). Portanto não foi possível prosseguir com a utilização de nenhum dos dois conjuntos de *primers* desenhados para *Streptococcus*.

Por fim apenas espécie do gênero *Weissella* dentre todos os outros tiveram fragmentos específicos de 16S rRNA gerados pelo conjunto de *primers* fD1/Wsla-179-R (condições de reação na Tabela 13); devido ao sucesso desse conjunto de *primers* não foi realizado teste com fD1/Wsla-132-R.

Tabela 13 – Condições determinadas experimentalmente para reações de PCR com os *primers* com especificidade comprovada pelos testes.

Gênero	Primer específico	Primer universal	Temperatura de anelamento	Concentração de MgCl ₂
<i>Bacillus</i>	Bcl-943-F e Bcl-1207-R	-	60°C	1,5 mM
<i>Burkholderia</i>	Brkh-138-R	fD1	60°C	1,5 mM
<i>Pseudomonas</i>	Psdm-110-F	357-341r	63°C	1,5 mM
<i>Weissella</i>	Wsla-179-R	fD1	63°C	1,5 mM

De maneira geral apenas os conjuntos de *primers* desenvolvidos para a amplificação de espécies de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Weissella* apresentaram especificidade suficiente para serem aproveitados para os experimentos de quantificação por qPCR.

Constantes eventos de amplificação do gene 16S rRNA de espécies de gêneros diferentes para os quais os *primers* foram desenhados ocorreram. Uma vez que espécies de todos esses gêneros possivelmente se encontram entre as amostras, quantificações errôneas poderiam ser realizadas caso esses *primers* sem especificidade fossem utilizados para técnica de qPCR. Insistir na otimização de condições para diminuir a ocorrência de amplificações cruzadas poderia invariavelmente resultar na queda simultânea da amplificação do alvo específico, limitando a utilização dos *primers* para experimentos de qPCR (MORALES; HOLBEN, 2009). A não especificidade de *primers* deve ser considerada muito problemática devido também ao fato que, dependendo da amostra analisada, a quantidade de moléculas de DNA molde não alvo presentes pode ser muito maior que as de DNA alvo. Isso provocaria maior consumo de *primers* para amplificação do alvo não específico, sendo assim as moléculas de DNA alvo presentes em menores quantidades não seriam detectadas (TORIJA et al., 2010).

A frequência de amplificação cruzada entre os gêneros foi frequentemente observada entre táxons próximos. A inespecificidade encontrada nos testes com os conjuntos de *primers* desenvolvidos para os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, por exemplo, ocorreu entre organismos desses mesmos gêneros. Todos eles são compostos por bactérias produtoras de ácido lático e fazem parte da mesma ordem *Lactobacillales*, portanto próximos filogeneticamente. Dentro os gêneros estudados *Pseudomonas* é o mais próximo de *Halomonas* (ambos pertencem à classe *Gammaproteobacteria*) e teve fragmentos do seu gene 16S rRNA amplificados por *primer* desenhado especificamente para espécies de *Halomonas*. A amplificação promovida por *primers* de *Alicyclobacillus* e *Staphylococcus* também ocorreu em espécies do gênero *Bacillus*, gêneros inclusos na ordem *Bacillales*. A relação filogenética simplificada entre os gêneros estudados pode ser observada na Figura 11.

É possível que as amplificações cruzadas observadas entre táxons filogeneticamente próximos estejam ocorrendo devido a pequenos *mismatches* entre as sequências dos *primers* específicos desenhados e as sequências do gene 16S rRNA de espécies dos gêneros não alvo. Uma diferença pequena na composição nucleotídica entre *primers* e as sequências é suficiente para promover um anelamento que habilite o início da extensão pela polimerase. Após a rodada inicial dessa extensão promovida pelo mau-pareamento, subseqüentes produtos de

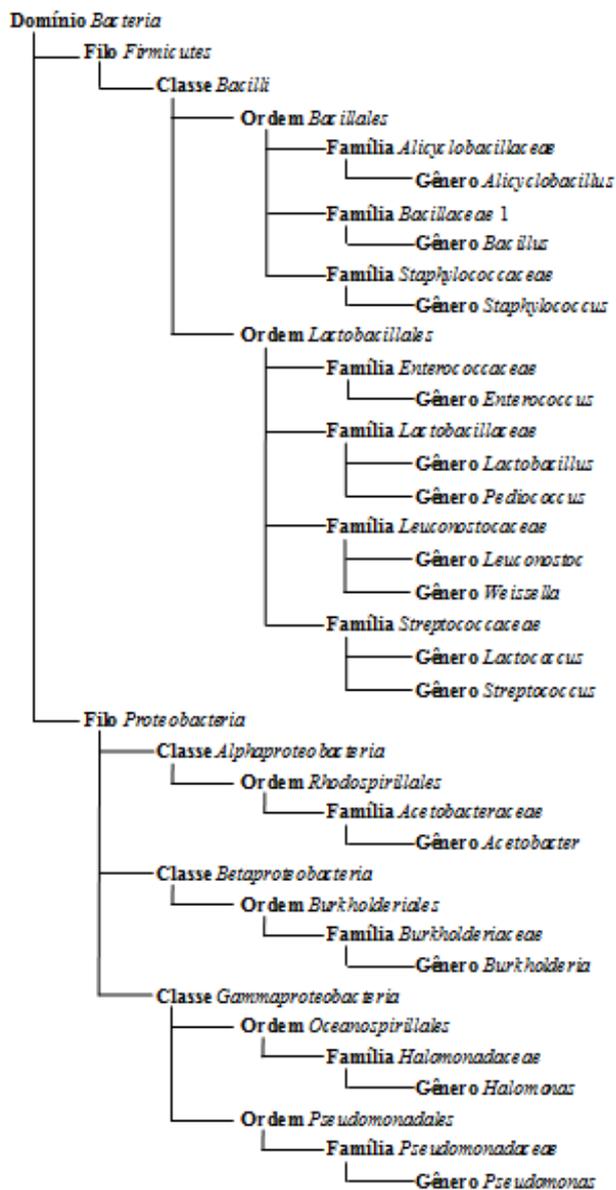


Figura 11 – Árvore filogenética simplificada baseada em classificação taxonômica pelo gene 16S rRNA destacando apenas os gêneros de interesse. O comprimento dos ramos não representa qualquer relação evolutiva entre os táxons.

PCR possuindo a exata sequência dos *primers* que estão sendo utilizados se acumulariam e passariam a ser amplificados com alta eficiência (MORALES; HOLBEN, 2009).

Apesar de ser um gene muito utilizado em estudos filogenéticos, em alguns casos o gene 16S rRNA não é considerado a melhor escolha para diferenciação entre espécies e eventos de identificação devido a sua natureza altamente conservada entre linhagens e espécies próximas (MUTHAIYAN; RICKE, 2010). Entre espécies de bactérias lácticas, estudos reportam possíveis limitações no uso de 16S rRNA devido a esse baixo poder

discriminatório em espécies filogeneticamente próximas (MOHANIA et al., 2008; PAROLO, 2009). A lenta evolução do gene 16S rRNA torna difícil o reconhecimento em eventos recentes na história da evolução das espécies, tais quais aqueles associados com especiação insipiente (STACKEBRANDT et al., 2002), o que pode também ser um fator contribuinte para os altos níveis de ligações inespecíficas de alguns conjuntos de *primers* utilizados nesse trabalho, o que também foi observado por Morales e Holben (2009) em seus resultados de testes de especificidade de *primers* desenhados para táxons específicos. Portanto, as pequenas diferenças na sequência do gene 16S rRNA utilizadas como premissa para o desenvolvimento dos *primers* específicos podem não ter sido suficiente para promover a amplificação apenas das espécies dos gêneros para os quais esses *primers* foram gerados, na maioria dos casos.

5.3.4 Identificação de fragmentos de 16S rRNA gerados por *primers* do gênero *Halomonas* em amostra de biofilme de dorna (BD)

O gênero *Halomonas* figurou como um dos principais contaminantes das amostras da primeira coleta, aparecendo em quase todos os pontos de coleta. Por conta disso, foi importante promover o desenvolvimento de *primers* capazes de amplificar seletivamente espécies desse gênero.

Não foi possível promover o teste dos *primers* desenhados para esse gênero utilizando como controle positivo espécies de *Halomonas* devido a problemas na obtenção de isolados durante o desenvolvimento deste trabalho. De qualquer maneira os testes procederam com os isolados representantes dos outros gêneros como controles negativos, como já apresentado.

Dos conjuntos de *primers* designados para a amplificação de espécies do gênero *Halomonas*, 341-357f/Hlm-604-R promoveu amplificação de fragmentos a partir do DNA de espécie de outro gênero (*Pseudomonas*); o par 341-357f/Hlm-446-R não gerou amplificação de nenhum isolado (Tabela 12). Ainda assim para ambos, procedeu-se com teste de PCR utilizando como molde DNA total obtido das amostras de BD e VINHO. O resultado dessa reação pôde ser avaliado pelo registro da eletroforese em gel de agarose (Figura 12).

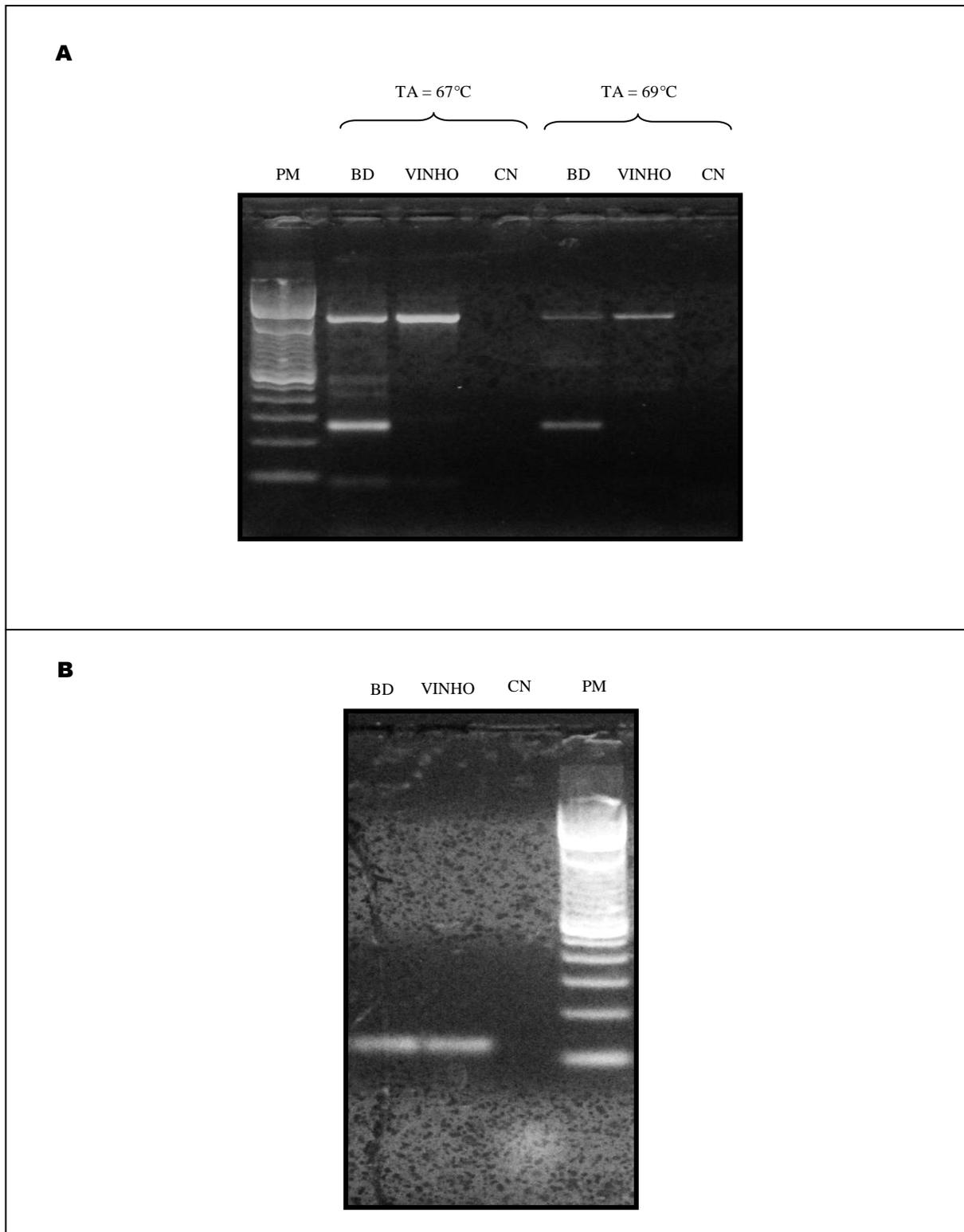


Figura 12 – Gel de agarose de amplificação de região do gene 16S rRNA de amostras de BD e VINHO com *primers* 341-357f/Hlm-604-R (fragmento esperado: 272 pb) utilizando diferentes temperaturas de anelamento (TA) (67°C e 69°C) e concentração final de MgCl₂ 1,5 mM (A) e com *primers* 341-357f/Hlm-446-R (fragmento esperado 114 pb) utilizando temperatura de anelamento 66°C (B) e concentração final de MgCl₂ 2,5 mM. PM: padrão molecular 100 pb *DNA Ladder* (Life Technologies). CN: controle negativo.

O conjunto de *primers* 341-357f/Hlm-446-R foi o que melhor apresentou especificidade na geração de fragmentos de tamanho esperados (114 pb) nas amostras de DNA de BD e VINHO após tentativas de ajustes que definiram a concentração final ideal de MgCl₂ 2,5 mM e temperatura de anelamento ideal 66°C em 35 ciclos. Os fragmentos gerados pela amplificação de DNA de BD com os *primers* 341-357f/Hlm-446-R nas condições descritas acima foram então utilizados para clonagem objetivando o sequenciamento. Esta técnica verificaria se dentre os fragmentos amplificados haveria alguma sequência pertencente à espécie de *Halomonas* sugerindo a presença do gênero neste ponto da coleta.

No total 60 clones foram selecionados e seqüenciados e desse total 53 seqüências de boa qualidade foram obtidas através da filtragem pelos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). Essas seqüências válidas foram submetidas à ferramenta *SeqMatch* do site RDP (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) (COLE et al., 2009), que retornou os seguintes acessos com maior similaridade encontradas (Tabela 14):

Tabela 14 – Análise por *SeqMatch* do RDP de seqüências obtidas dos clones contendo fragmento do gene 16S rRNA amplificado com *primer* específico desenhado para o gênero *Halomonas*.

Clone	GenBank	Nome da espécie	Família	S_ab score
1	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.991
2	AM111081	<i>Halomonas</i> sp. 8047	<i>Halomonadaceae</i>	0.890
3	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.972
4	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.991
5	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.972
6	AY834756	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> ; 2c	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.825
7	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.991
8	AM398222	<i>Halomonas</i> sp. EP13	<i>Halomonadaceae</i>	0.899
9	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.972
10	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.967
11	AY753172	<i>Enterobacter</i> endosymbiont of <i>Metaseiulus occidentalis</i> ; pAJ239	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.889
12	Z76737	<i>Xenorhabdus nematophila</i> ; N2-4	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.891
13	AF025369	<i>Citrobacter murlinae</i> (T); CDC 2970-59	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.990
14	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
15	FJ445213	<i>Pantoea</i> sp. NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.944

(continua)

(conclusão)

Clone	GenBank	Nome da espécie	Família	S_ab score
16	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.991
17	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.991
18	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
19	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.925
20	AJ233406	<i>Buttiauxella warmboldiae</i> (T); DSM 9404	<i>Enterobacteriaceae</i>	1.000
21	FJ611882	<i>Enterobacter sp.</i> ATCC 27985	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.903
22	AJ233406	<i>Buttiauxella warmboldiae</i> (T); DSM 9404;	<i>Enterobacteriaceae</i>	1.000
23	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
24	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.944
25	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
26	FJ611882	<i>Enterobacter sp.</i> ATCC 27985	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.936
27	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.908
28	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.972
29	AF025369	<i>Citrobacter murlinae</i> (T); CDC 2970-59	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.990
30	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
31	FN555398	<i>Enterobacter sp.</i> I-Bh15-16	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.870
32	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.960
33	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
34	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.908
35	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.961
36	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.972
37	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
38	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.908
39	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
40	AF025369	<i>Citrobacter murlinae</i> (T); CDC 2970-59	<i>Enterobacteriaceae</i>	1.000
41	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.990
42	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
43	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.960
44	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
45	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
46	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
47	EU047557	<i>Enterobacter sp.</i> TMPSB-P4; TMPSB-T10	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.935
48	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
49	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
50	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.964
51	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.908
52	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.970
53	FJ445213	<i>Pantoea sp.</i> NIIST-167	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.972

Dos 53 clones avaliados, dois (clones 2 e 8) apresentaram conter sequência do gene 16S rRNA com maior similaridade com as de espécies de *Halomonas* (*Halomonas sp.*, nos dois casos). Isso é mais um indicativo da possível presença do gênero na amostra de BD, assim como o encontrado pelas análises de identificação por T-RFLP, embora isso não possa ser afirmado com veemência. O tamanho do fragmento do gene 16S rRNA clonado e sequenciado (114 pb) não é o suficiente para possibilitar uma inferência filogenética segura; o tamanho mínimo aconselhado para promover uma identificação precisa deve ser de 500 a 525 pb (JANDA; ABBOTT, 2007).

Os outros 51 clones apresentaram sequências similares a outras espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, dentre essas se destacando principalmente a espécie *Pantoea sp.* A frequência de aparecimento dessa espécie nos resultados de sequenciamento não deve ser relacionada necessariamente a uma predominância deste organismo na amostra de BD. É possível que a presença de espécies em comunidades microbianas seja estimada erroneamente devido ao diferente número de cópias do gene 16S rRNA que podem ser encontradas no genoma de diferentes organismos (FARRELLY; RAINEY; STACKEBRANDT, 1995; PEI, 2010).

Espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* já foram detectadas por isolamento em meio de cultura em outros trabalhos em amostras provenientes de processo de produção de etanol (GALLO, 1990; SILVA, 1988). Dentre as amostras coletadas para este estudo, apenas o gênero *Serratia* foi encontrado em BD. Novamente, devido ao pequeno tamanho do fragmento do gene 16S rRNA sequenciado pode não ter sido possível detectar com confiança de qual ou quais espécies de *Enterobacteriaceae* os fragmentos clonados tiveram procedência. Janda e Abbott (2007) relatam que grupos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são dificilmente identificados/diferenciados por sequenciamento do gene 16S rRNA. Ainda assim é possível que as espécies identificadas pelo sequenciamento dos clones estejam presentes na amostra BD, mas não foram detectadas eficientemente pela técnica de T-RFLP.

Portanto, foi possível obter a amplificação de fragmentos de 16S rRNA possivelmente de espécie do gênero *Halomonas* através da utilização dos *primers* 341-357f/Hlm-446-R designados especificamente para isto, no entanto ocorreu também a amplificação de outros gêneros. Esse resultado inviabilizou a utilização dos *primers* para os procedimentos de quantificação via qPCR mas de qualquer maneira indicou mais uma vez que espécies de

Halomonas podem fazer parte da comunidade microbiana de BD, fonte pela qual podem ser reinsersidas no processo em contato com outras amostras. Portanto mais estudos seriam necessários para confirmar a presença de *Halomonas* entre as amostras e para descobrir quais as consequências disso para o processo fermentativo alcoólico.

5.4 PCR quantitativo em tempo-real (qPCR)

Após avaliar a relação entre as comunidades microbianas dos pontos de coleta do sistema de fermentação em estudo e identificar quais os principais contaminantes, prosseguiu-se com as análises de quantificação gênero-específica.

O objetivo desta análise foi quantificar o número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* e dos gêneros específicos em amostras de diferentes pontos do processo fermentativo. A partir dessa informação seria possível inferir uma estimativa do número de células bacterianas táxon-específicas presentes por unidade de massa ou volume de amostra analisada. É importante para a indústria detectar o quanto antes o nível da contaminação provocada pelos micro-organismos, pois se combatidas no início raras vezes as bactérias atingem níveis críticos (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

Além da quantificação do número de cópias de 16S rRNA de bactérias totais, foram desenvolvidos ensaios para quantificação de cópias do mesmo gene pertencente a espécies dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Weissella*. Apenas esses gêneros apresentaram *primers* com especificidade esperada de acordo com os testes realizados já descritos. As condições para viabilizar a realização das reações de qPCR também já foram determinadas nos testes anteriores (Tabela 13).

As características das curvas padrões desenvolvidas para a quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* e dos gêneros específicos nas amostras estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15 – Características das curvas padrões desenvolvidas para quantificação de cópias do gene 16S rRNA de *Bacteria* e dos gêneros específicos.

Táxon	Isolado fornecedor do DNA utilizado para construção da curva padrão	Diluições de cópias de fragmentos	Eficiência da amplificação	Coefficiente de relação (R^2)
<i>Bacteria</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (DSM 11319)	10^7 a 10^2	97,48%	0,995
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> (FT127)	10^5 a 10^0	70,00 %	0,992
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (DSM 11319)	10^8 a 10^4	68,04 %	0,999
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (DSM 6506)	10^7 a 10^2	73,00 %	0,998
<i>Weissella</i>	<i>Weissella cibaria</i> (FT005)	10^6 a 10^1	68,03 %	0,994

Todas as amostras foram inicialmente pré-amplificadas em 10 ciclos com os *primers* fD1 e rD1 para *Bacteria* e então submetidas aos experimentos de quantificações. Essa estratégia foi realizada para possibilitar a detecção de organismos presentes em quantidades muito pequenas nas amostras, seguindo a mesma estratégia de outros autores (GONZALES; PORTILLO; SAIZ-JIMENEZ, 2005).

Foi checada a especificidade das reações para cada táxon alvo através da análise das curvas de *melting* (Figura 13).

As curvas de *melting* são capazes de diferenciar fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com composição de bases nucleotídicas diferentes. Nesses casos diferentes picos de *melting* podem surgir (RIRIE; RASMUSSEM; WITTEWER, 1997). Diferenças de poucas bases entre fragmentos de mesmo tamanho podem resultar numa diferença de temperatura de *melting* (TM) de 1 – 5°C (KE; WARTELL, 1993). Esse tipo de situação pode ocorrer quando se amplifica uma mesma região do gene 16S rRNA de espécies diferentes. Portanto, nas análises deste estudo apenas reações que apresentaram variação de até 5°C de TM entre as amostras foram consideradas específicas e válidas para o propósito de quantificação.

De acordo com essa condição apenas a reação para amplificação de *Bacillus* com os *primers* Bcl-943-F e Bcl-1207-R teve de ser desconsiderada para análises de quantificação, pois a variação entre as TM das amostras foi de 10,98°C. As reações com *primers* de todos os outros táxons incluíram-se seguramente dentro da faixa aceitável de variação de TM entre as amostras (Tabela 16).

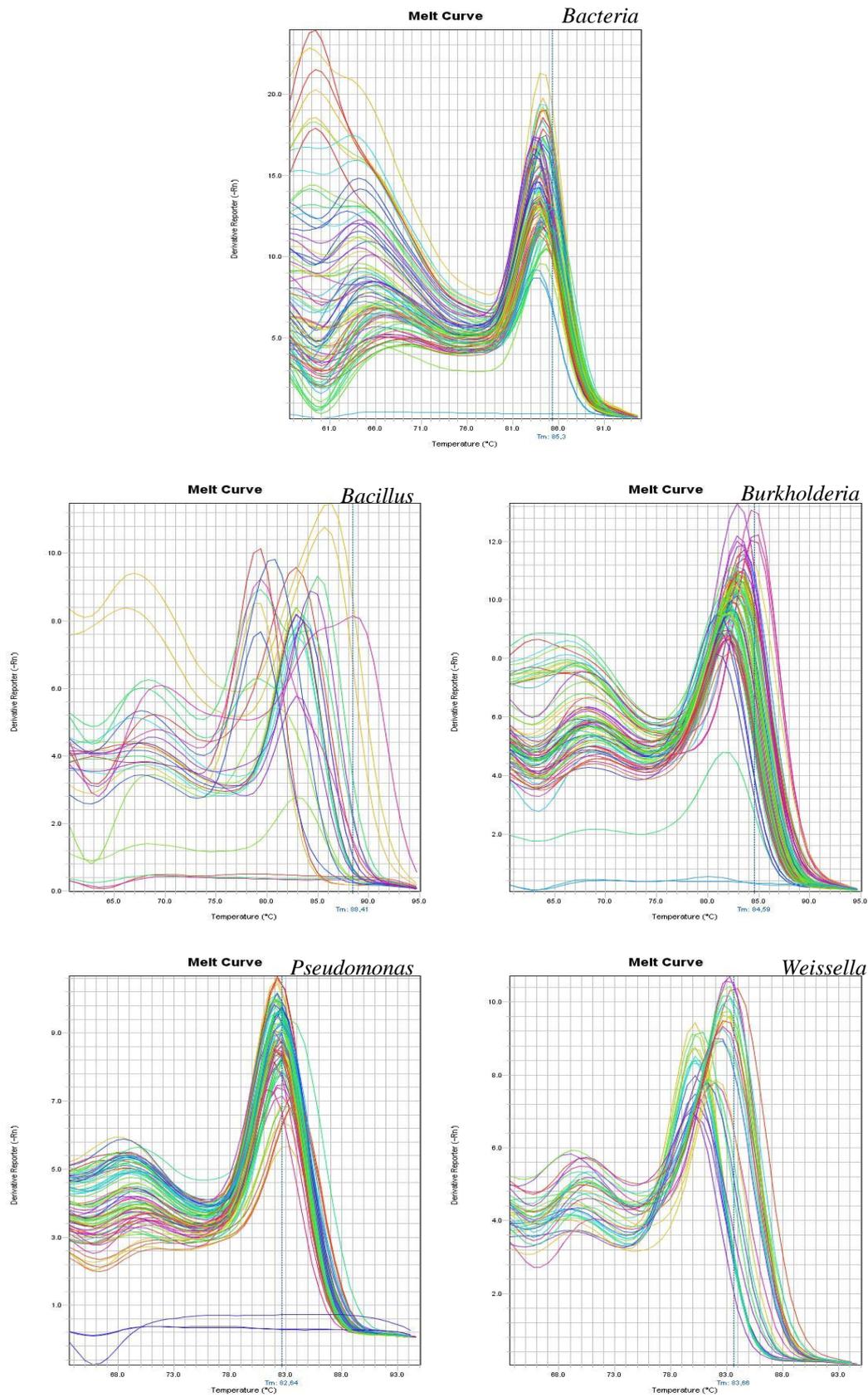


Figura 13 – Curvas de *melting* das ampliações do gene 16S rRNA de *Bacteria* e dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Weissella* nas amostras coletadas.

Tabela 16 – Valores de temperatura de *melting* da curva padrão e das amostras obtidos pela análise da curva de *melting* das reações de qPCR com *primers* específicos para cada táxon alvo.

Táxon alvo	TM (°C) da curva	TM (°C) das amostras			
	padrão (média)	Mínima	Máxima	Média	Variação
<i>Bacteria</i>	84,29	83,59	84,62	83,98	1,03
<i>Bacillus</i>	83,00	70,01	88,40	80,99	10,98
<i>Burkholderia</i>	83,18	81,47	84,59	82,71	3,12
<i>Pseudomonas</i>	82,15	81,62	83,99	82,53	2,37
<i>Weissella</i>	80,29	79,70	84,67	81,62	4,97

Primeiramente os resultados forneceram a quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA de cada táxon analisado (Tabelas 17 e 18). Em alguns casos a quantificação por qPCR acusou a presença de gêneros que não haviam sido detectados por T-RFLP em algumas amostras (presença de *Burkholderia* em BD, BCEN, MEL, MST e PC; presença de *Pseudomonas* em BH2O, BT, BD, MEL, MST e PC; presença de *Weissella* em BH2O, BT, BD, BCEN, MEL, PC e 2BH2O). Isso pode ter ocorrido devido à possibilidade dos *primers* específicos serem capazes de se anelarem ao DNA de outras espécies do mesmo gênero para os quais foram desenvolvidos. Essas espécies possivelmente estão presentes e podem não ter sido detectadas por T-RFLP devido à limitação da faixa de tamanho dos T-RFs analisados (30 a 650 pb).

A partir do valor de cópias do gene 16S rRNA obtido foi possível estimar a quantidade de células bacterianas totais e de cada gênero presentes em cada amostra. Essa estimativa foi realizada dividindo o número de cópias encontrado em cada amostra pela média do número de cópias do gene presentes nos genomas das espécies de cada táxon analisado. Essa informação foi fornecida pelo site *rrnDB - the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database* (<http://rrndb.mmg.msu.edu/>) (KLAPPENBACH et al., 2001; LEE; BUSSEMA; SCHMIDT, 2009). O domínio *Bacteria* possui uma média de 4,03 cópias do gene 16S rRNA presentes no genoma de suas espécies (informação baseada em 1124 sequências de genomas analisados); o gênero *Burkholderia* apresenta em média 5,17 cópias baseado em 24 sequências de genomas analisados; o gênero *Pseudomonas* apresenta 5,04 cópias do gene baseado num total de 41 sequências de genomas analisados; por fim, o gênero *Weissella* possui uma média de 5 cópias do gene 16S rRNA de acordo com o genoma de 1 única espécie disponível (número de acesso no *GenBank*: NC_015759).

Uma aproximação da quantidade de unidades formadoras de colônia de cada táxon analisado presentes nas amostras da primeira e segunda coleta está apresentada nas Figuras 14 e 15.

Entre as amostras de biofilme, BCEN apresentou a maior quantidade de bactérias totais presentes por miligrama de material, tanto na primeira coleta ($1,93E+06$ UFC.mg⁻¹) quanto na segunda ($2,14E+07$ UFC.mg⁻¹). A quantidade de bactérias pertencentes a espécies dos outros gêneros analisados (*Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Weissella*) também foi maior entre as amostras de BCEN nos dois momentos de amostragens.

Entre todas as amostras de biofilme da primeira coleta o gênero que predomina entre os analisados é *Burkholderia* (exceto em BT que é *Pseudomonas*). Entre as amostras de biofilme da segunda coleta *Burkholderia* e *Pseudomonas* predominam equivalentemente entre as amostras 2BH2O e 2BCEN. Entretanto, *Burkholderia* não foi detectada nas amostras 2BT e 2BD.

Entre as amostras líquidas, PC apresentou a maior quantidade de bactérias totais presentes por mililitro entre as amostras da primeira coleta ($1,03E+08$ UFC.ml⁻¹). No momento da segunda coleta 2PC e 2PCT apresentaram as maiores quantidades de unidades formadoras de colônia ($2,96E+06$ e $6,15E+06$ UFC.ml⁻¹, respectivamente). Isso indica mais uma vez que o tratamento ácido com H₂SO₄ realizado com o levedo pode não estar sendo eficiente; não obstante, a técnica aqui utilizada para quantificação pôde ter detectado material genético das células mortas presentes na amostra de 2PCT. A amostra de biofilme da centrífuga entra constantemente em contato com o levedo no momento da centrifugação do mosto fermentado. A ocorrência alta de células presentes entre as amostras BCEN e 2BCEN pode refletir numa maior ocorrência também entre as amostras PC, 2PC e 2PCT, como observado.

Nas amostras líquidas da primeira coleta, *Burkholderia* superou todos os outros gêneros analisados em número de unidades formadoras de colônias, menos em VINHO (onde não foi detectado) que é dominado por *Pseudomonas*. Entre as amostras líquidas da segunda coleta *Burkholderia* manteve seu predomínio apenas na amostra 2MST em relação à *Pseudomonas* e *Weissella*. Esses dois últimos gêneros apresentaram praticamente os mesmos níveis de contaminantes entre as outras amostras analisadas.

Tabela 17 – Abundância do número total de cópias do gene 16S rRNA (cópias.mg⁻¹) dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras de biofilme da primeira e segunda coleta.

Amostra	<i>Bacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Weissella</i>
BH20	5,23E+05 ±9,56E+03	3,62E+05 ±8,11E+04	6,55E+04 ±5,70E+03	3,70E+02 ±5,36E+01
BT	1,63E+06 ±2,80E+04	0	8,20E+04 ±1,28E+04	1,40E+03 ±7,98E+01
BD	1,39E+06 ±3,58E+04	1,11E+06 ±1,90E+05	3,91E+05 ±2,50E+04	2,67E+03 ±1,68E+02
BCEN	7,76E+06 ±5,12E+05	3,21E+06 ±5,45E+05	9,14E+05 ±1,26E+05	5,93E+03 ±6,21E+02

Amostra	<i>Bacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Weissella</i>
2BH20	4,61E+05 ±2,59E+04	3,28E+05 ±5,14E+04	8,07E+04 ±1,11E+04	5,24E+02 ±1,83E+01
2BT	1,06E+04 ±6,52E+02	0	3,06E+02 ±1,64E+02	6,60E+02 ±6,24E+01
2BD	1,20E+05 ±1,32E+03	0	1,28E+04 ±2,31E+03	6,15E+02 ±8,88E+01
2BCEN	8,64E+07 ±3,31E+06	6,20E+07 ±4,12E+07	1,85E+07 ±1,94E+06	3,99E+05 ±2,04E+04

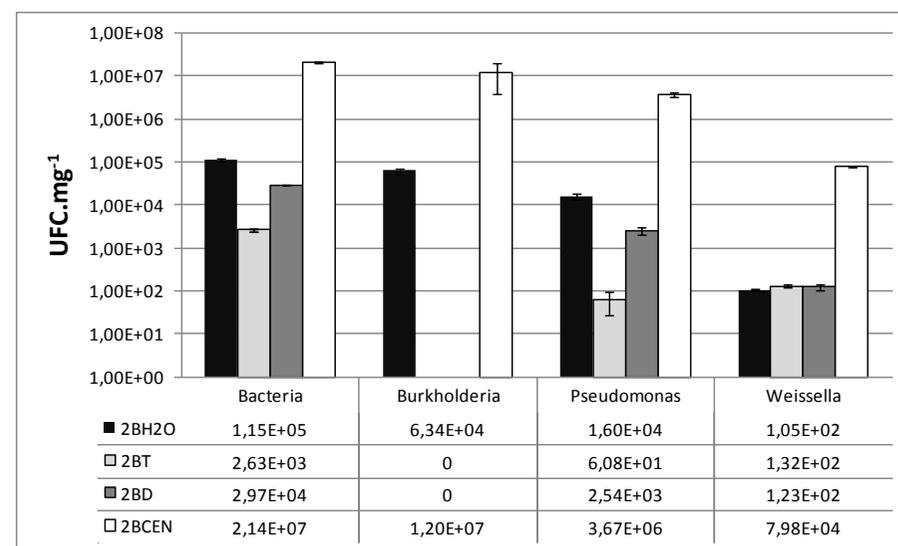
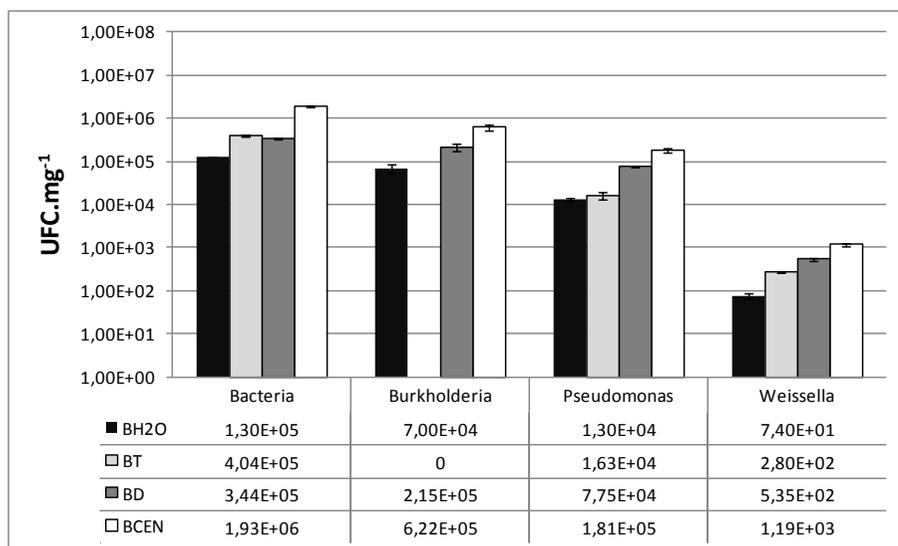


Figura 14 – Estimativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC.mg⁻¹) de bactérias dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras de biofilme da primeira e segunda coleta. Nas barras dos gráficos está representado o erro padrão das réplicas técnicas.

Tabela 18 – Abundância do número total de cópias do gene 16S rRNA (cópias.ml⁻¹) dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras líquidas da primeira e segunda coleta.

Amostra	<i>Bacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Weissella</i>
MEL	1,23E+06 ±4,72E+04	1,11E+06 ±2,52E+05	1,17E+05 ±8,27E+03	2,70E+03 ±1,72E+02
MST	4,13E+06 ±8,36E+04	1,37E+06 ±2,71E+05	4,48E+05 ±3,12E+04	2,10E+04 ±1,36E+03
PC	4,17E+08 ±1,05E+07	1,85E+08 ±2,85E+07	4,61E+07 ±5,86E+06	3,37E+04 ±8,70E+03
VINHO	2,43E+07 ±1,61E+06	0	1,07E+06 ±2,72E+04	5,04E+05 ±1,39E+04

Amostra	<i>Bacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Weissella</i>
2MEL	2,68E+05 ±1,55E+04	0	1,00E+04 ±1,47E+03	3,26E+05 ±8,13E+04
2MST	2,02E+06 ±3,66E+04	1,69E+06 ±3,65E+05	4,69E+05 ±3,83E+04	1,27E+05 ±1,23E+04
2PC	1,19E+07 ±9,06E+05	0	9,11E+05 ±5,66E+03	1,01E+05 ±1,54E+03
2PCT	2,48E+07 ±8,87E+05	0	1,99E+06 ±9,33E+04	3,99E+04 ±8,08E+02
2VINHO	2,36E+06 ±5,01E+05	0	2,32E+05 ±2,89E+04	7,24E+05 ±1,34E+04

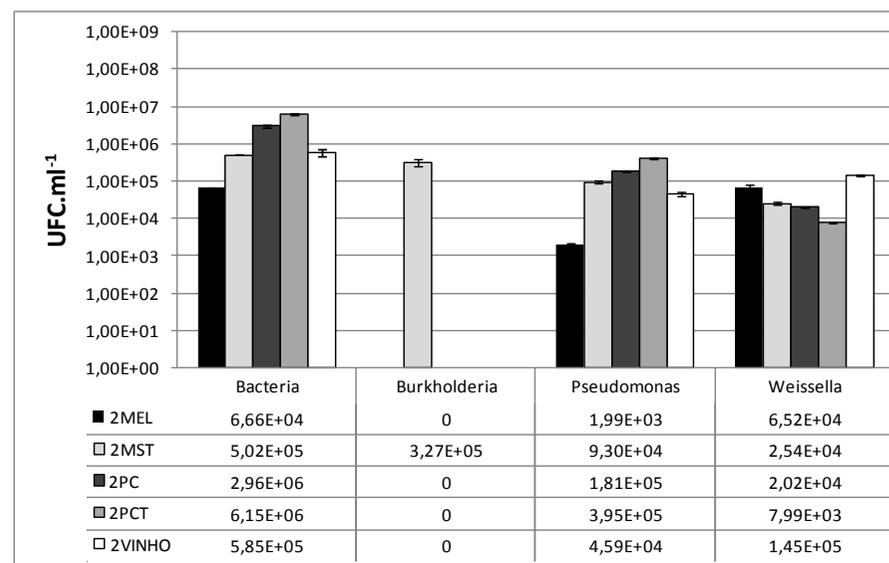
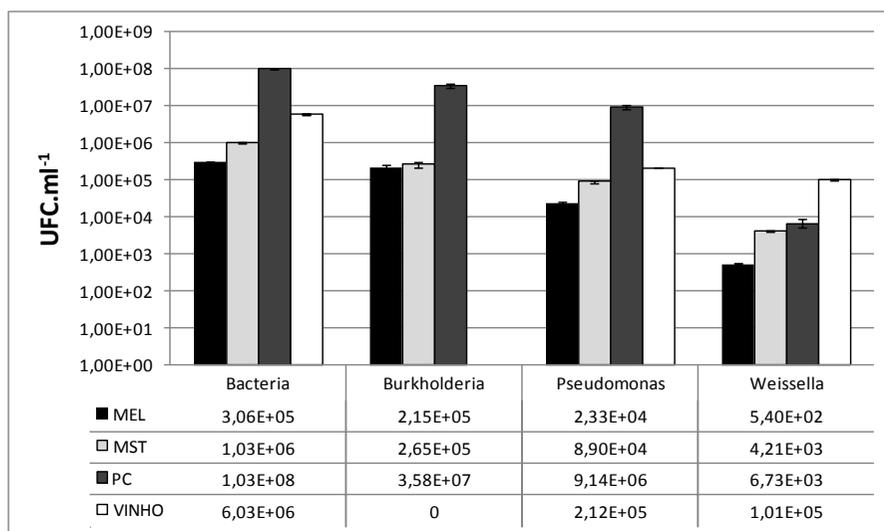


Figura 15 – Estimativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC.ml⁻¹) de bactérias dos táxons analisados por qPCR a partir de amostras líquidas da primeira e segunda coleta. Nas barras dos gráficos está representado o erro padrão das réplicas técnicas.

Entre a maioria das amostras líquidas não foram encontrados níveis menores de 10^5 células de bactérias totais por mililitro (exceto para 2MEL que apresentou $6,66E+04$ UFC.ml⁻¹) corroborando a afirmação de Andrietta et al. (2006) que dizem que dificilmente se encontram níveis de contaminantes menores que este em processos fermentativos saudáveis. Os níveis de contaminação entre a maioria das amostras não ultrapassou a marca de 10^7 UFC.ml⁻¹ (exceto para a amostra PC, $1,03E+08$ UFC.ml⁻¹). Contaminações acima desse nível já podem causar quedas significativas no rendimento fermentativo (AMORIM; OLIVEIRA; CAMPOS, 1981; OLIVA-NETO, 1995).

Ngang et al. (1990) mostraram que a contaminação por *Lactobacillus* da ordem de 10^4 UFC.ml⁻¹ já é capaz de causar inibição da produção de etanol a partir de melão obtido de beterraba. Para Narendranath (2010) a cada 10^7 células de *Lactobacillus* por mililitro de amostra há perda de aproximadamente 1% na produção do etanol. Lucena et al. (2010) também já encontraram variações de $6,0 \times 10^5$ a $8,9 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ de bactérias produtoras de ácido lático presentes em tanques de fermentação de diferentes destilarias brasileiras através de métodos de cultivo. Não foi possível realizar a quantificação do gênero *Lactobacillus*, mas o T-RFLP indicou a presença desse gênero em quase todas as amostras nos dois momentos de coleta, portanto é possível que espécies desse gênero tenham alcançado esse nível de contaminação e estejam causando perdas de rendimento no processo fermentativo. A quantificação de *Weissella*, gênero produtor de ácido lático assim como *Lactobacillus*, foi detectada em níveis de 10^5 em amostras de vinho (VINHO: $1,01E+05$ UFC.ml⁻¹ e 2VINHO: $1,45E+05$ UFC.ml⁻¹) indicando a possibilidade de provocarem danos ao processo fermentativo. Bactérias produtoras de ácido lático são as que encontram melhores condições de se desenvolverem nos processos fermentativos e, portanto, podem atingir um alto crescimento caso não sejam detectadas a tempo, causando prejuízos.

A técnica de qPCR aplicada para a quantificação dos micro-organismos contaminantes apresentou resultados equivalentes com os já retratados pela literatura podendo, portanto, servir como fonte de informação quantitativa rápida nos casos onde as contaminações pelos gêneros analisados são frequentes.

6. CONCLUSÕES

A aplicação da técnica de T-RFLP com as enzimas selecionadas foi capaz de caracterizar a composição das comunidades microbianas presentes nas amostras representantes dos pontos de coleta do sistema de produção de etanol.

Os resultados indicaram que as amostras de biofilme têm uma participação direta e de destaque na reintrodução dos contaminantes nas dornas de fermentação, afetando frequentemente o rendimento do processo fermentativo. As amostras de água e melaço podem servir como fonte de entrada para novos micro-organismos contaminantes, mas são nos biofilmes que eles conseguem se alojar e permanecer no sistema por várias etapas de fermentação, em qualquer momento.

O processo de identificação dos contaminantes por T-RFLP (inédito entre esses tipos de amostras) gerou uma quantidade muito grande de possíveis contaminantes, fato não comumente registrado por outros trabalhos. Provavelmente a escolha do gene 16S rRNA para promover a identificação em nível de espécie não foi a ideal. Por se tratar de um gene evolutivamente conservado, sua sequência pode não ter sido discriminatória o suficiente para diferenciar com segurança pela técnica de T-RFLP espécies próximas filogeneticamente, como são as que costumam ocorrer com frequência em amostras provenientes de sistemas fermentativos. A identificação em nível de gênero pôde trazer maior confiabilidade aos dados a partir da utilização das seis enzimas de restrição selecionadas. Mais uma vez os gêneros de destaque entre os contaminantes foram *Bacillus* e *Lactobacillus* (entre outras bactérias produtoras de ácido lático) mesmo em processo fermentativo com alto teor alcoólico como o que serviu de modelo para o estudo, estando também presentes em quase todas as amostras de biofilme. O gênero *Halomonas*, nunca antes retratado como contaminante da produção de etanol foi detectado e, por ser capaz de utilizar sacarose para a produção do levânio pode oferecer prejuízos ao processo. Mais estudos são necessários para comprovar essa interferência.

A técnica de qPCR pôde proporcionar uma quantificação estimada dos micro-organismos totais contaminantes presentes nas amostras analisadas. Foi constatado que a técnica de T-RFLP não poderia oferecer com precisão essa informação. A detecção por esse método é um excelente e rápido método de alerta para a usina para que providências sejam

tomadas para controlar a contaminação. Não foi possível realizar a quantificação da maioria dos gêneros contaminantes destacados. A maioria dos *primers* desenhados não apresentou especificidade necessária, mais uma vez devido à natureza conservativa da sequência do gene 16S rRNA. No entanto as estimativas da quantidade de contaminantes totais e dos gêneros analisados geraram valores que refletem uma situação que demanda cuidados a serem tomados para conter um maior avanço da contaminação evitando que prejuízos maiores ocorram.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, p. 215-223, 2002.
- ALCARDE, V. E.; YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 21, p. 40-43, 2003.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. D.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, J. V. D. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar e Álcool**, v. 5, p. 12-18, 1982.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 1981, Rio de Janeiro. **Anais...** Piracicaba: STAB, 1981. p.158-168.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol: Brasil 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, Campinas, v. 7, p. 1-16, 2006.
- ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação etanólica**. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2012.
- ASHELFORD, K. E.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and *primers* in conjunction with the RDP-II database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, p. 3481-3488, 2002.
- AVANISS-AGHAJANI, E.; JONES, K.; HOLTZMAN, A.; ARONSON, T.; GLOVER, N.; BOIAN, M.; FROMAN, S.; BRUNK, C. F. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 98-102, 1996.
- BAVYKIN, S. G.; LYSOV, Y. P.; ZAKHARIEV, V.; KELLY, J. J.; JACKMAN, J.; STAHL, D. A.; CHERNI, A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 3711-3730, 2004.

BELILA, A.; SNOUSSI, M.; HASSAN, A. Rapid qualitative characterization of bacterial community in eutrophicated wastewater stabilization plant by T-RFLP method based on 16S rRNA genes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 28, p. 135-143, 2012.

BERKELEY, R. C. W.; ALI, N. Classification and identification of endospore forming bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 76, p. S1-S8, 1994.

BLACKWOOD, C. B.; MARSH, T.; KIM, S. H.; PAUL, E. A. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 926-932, 2003.

BLACKWOOD, C. B.; OAKS, A.; BUYERS, J. S. Phylum- and class-specific PCR *primers* for general microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6193-6198, 2005.

BOUCHOTROCH, S.; QUESADA, E.; IZQUIERDO, I.; RODRIGUEZ, M.; BEJAR, V. Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 24, p. 374-378, 2000.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, New York, v. 36, p. 214-216, 2004.

BROSIUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. J.; NOLLER, H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia Coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 75, p. 4801-4805, 1978.

BYUN, R.; NADKARNI, M. A.; CHHOUR, K. L.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 3128-3136, 2004.

CARVALHO, C. C. C. R. Biofilms: recent developments on an old battle. **Recent Patents on Biotechnology**, Oak Park, v. 1, p. 49-57, 2007.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 f. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CLEMENT, B. G.; KEHL, L. E.; DEBORD, K. L.; KITTS, C. L. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 31, p. 135-142, 1998.

COCKERILL, F. R.; SMITH, T. F. Rapid-cycle real-time PCR: a revolution for clinical microbiology; Automated extractions, self-contained PCR instruments, and other

improvements yield easy-to-run diagnostic tests. **ASM News**, Washington, v. 68, p. 77-83, 2002.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxon, v. 5, p. 719-729, 2003.

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. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 141-145, 2009.

CORNISHBOWDEN, A. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic-acid sequences: recommendations 1984. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, p. 3021-3030, 1985.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CULLIMORE, D.R. gRAM Positive Cocci (Section 12). In: _____. **Bacterial identification**. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap.5, p. 69-84.

CULMAN, S. W.; GAUCH, H. G.; BLACKWOOD, C. B.; THIES, J. E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: a comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

DEASY, B. M.; REA, M. C.; FITZGERALD, G. F.; COGAN, T. M.; BERESFORD, T. P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 23, p. 510-522, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-18, 1990.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p. 155-166, 2002.

EDEL-HERMANN, V.; DREUMONT, C.; PÉREZ-PIQUERES, A.; STEINBERG, C. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 397-404, 2004.

ENGBRETSON, J. J.; MOYER, C. L. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4823-4829, 2003.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Plainview, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HIJJIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Plainview, v. 8, p. 175-185, 1998.

FARRELLY, V.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 2798-2801, 1995.

FELSKE, A.; OSBORN, A. M. DNA fingerprinting of microbial communities. In: OSBORN, A. M.; SMITH, C. J. (Eds.). **Molecular microbial ecology**. New York: Taylor & Francis, 2005. chap. 3, p. 65-96.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 4630-4636, 1999.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1990. 388 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, p. 30-34, 1992.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. (Eds.). **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer, 2008. chap 1, p. 1-30.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 19-34, 2001.

GONZALEZ, J. M.; PORTILLO, M. C.; SAIZ-JIMENEZ, C. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. **Environmental Microbiology**. Oxon, v. 7, p. 1024-1028, 2005.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Plainview, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOTTENBOS, B.; BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. van der. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, Dordrecht, v. 13, p. 717-722, 2002.

GRÜNTZIG, V.; STRES, B.; AYALA DEL RÍO, H.L.; TIEDJE, J. M. **Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis**. Michigan State University, 2002. Disponível em: <http://rdp.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html>. Acesso em: 15 jul. 2007.

GUILBAUD, M.; COPPET, P.; BOURION, F.; RACHMAN, C.; PREVOST, H.; DOUSSET, X. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2190-2194, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford, v.41, p.95-98, 1999.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck, 1901, 212^{AL}. In: BERGEY, D. H.; BOONE, D. R. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, New York: Springer, 2009. v. 3, p. 465-511.

HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 114-123, 2002.

HEIST, P. Identifying, controlling the most common microbial contaminants. **Ethanol Producer Magazine**. Disponível em: <<http://www.ethanolproducer.com/articles/5464/identifying-controlling-the-most-common-microbial-contaminants>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

HERMANSSON, A.; LINDGREN, P. E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 972-976, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

HUEY, B.; HALL, J. Hypervariable DNA fingerprint in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 171, p. 2528-2532, 1989.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 2761-2764, 2007.

JANG, J. C.; KIM, B.; LEE, J.; HAN, H. G. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, p. 295-302, 2003.

JARMAN, S. N. Cleaver: software for identifying taxon specific restriction endonucleases recognition sites. **Bioinformatics Advance Access**, Oxford, v. 22, p. 2160-2161, 2006.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 139-155, 1996.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Genomics**, San Diego, v. 98, p. 137-144, 2011.

KANG, S. A.; JANG, K. H.; SEO, J. W.; KIM, K. H.; KIM, Y. H.; RAIRAKHWADA, D.; SEO, M. Y.; LEE, J. O.; HA, S. D.; KIM, C. H.; RHEE, S. K. Levan: applications and perspectives. In: REHM, B. H. A. (Ed). **Microbial production of biopolymers and polymer precursors**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. chap. 6, p. 145–161.

KAO, Y. T.; LIU, Y. S.; SHYU, Y. T. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International**, Amsterdam, v. 40, p. 71-79, 2007.

KE, S. H.; WARTELL, R. M. Influence of nearest neighbor sequence on the stability of base pair mismatches in long DNA: determination by temperature-gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, p. 5137-5143, 1993.

KLAPPENBACH, J. A.; SAXMAN, P. R.; COLE, J. R.; SCHMIDT, T. M. rrnDB: the ribosomal RNA operon copy number database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, p. 181-184, 2001.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 8, p. 257-260, 2002.

KRAM, J. W. Killing bad bugs without residues. **Ethanol Producer Magazine**. Disponível em: <<http://www.ethanolproducer.com/articles/4256/killing-bad-bugs-without-residues>>. Acesso em: 11 jun. 2012.

KUBOTA, H.; SENDA, S.; NOMURA, N.; TOKUDA, H.; UCHIYAMA, H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental Stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 106, p. 381-386, 2008.

KUCUKASIK, F.; KAZAK, H.; GUNEY, D.; FINORE, I.; POLI, A.; YENIGUN, O.; NICOLAUS, B.; ONER, E. T. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 89, p. 1729-1740, 2011.

KWON, H. S.; YANG, E. H.; YEON, S. W.; KANG, B. H.; KIM, T. Y. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 239, p. 267-275, 2004.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. Chichester: Wiley, 1991. p. 115-175.

LAVANHOLI, M. G. D. P. Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar e álcool. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap. 32, p. 697-721.

LAWLOR, K. A. *Alicyclobacillus* sp.: a growing concern for manufacturers of shelf-stable, high-acid, non-carbonated beverages. In: CONFERENCE ON SUGAR PROCESSING RESEARCH, 2006, Águas de São Pedro. **Resumos...** Valhalla: PepsiCo, 2006.

LEE, Z. M.; BUSSEMA, C.; SCHMIDT, T. M. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 489-493, 2009.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, New York, v. 129, p. 271-280, 2001.

LIESACK, W.; WEYLAND, H.; STACKEBRANDT, E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rRNA analysis of mixed culture of strict barophilic bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v. 21, p. 191-198, 1991.

LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro**, v. 83, p. 21-27, 1974.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; FORNEY, L. J. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 37, p. 417-422, 1998.

LOGAN, N. A.; VOS, P. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In: BERGEY, D. H.; BOONE, D. R. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2009. v. 3. p. 21-128.

LUCENA, B. T. L.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p. 298, 2010.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 63-68, 2001.

LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M. W. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by

using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 320-326, 2003.

LUSHIA, W.; HEIST, P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. **Ethanol Producer Magazine**, Grand Forks, p. 80-82, 2005.

MAAREL, M. J. E. C. van der; ARTZ, R. R. E.; HAANSTRA, R.; FORNEY, L. J. Association of marine *archaea* with the digestive tracts of two marine fish species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2894-2898, 1998.

MADANI, M.; SUBBOTIN, S.A.; MOENS, M. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallid*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 81-86, 2005.

MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplifications products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 323-327, 1999.

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J.; TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MAUKONEN, J.; MATTO, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 30, p. 327-356, 2003.

MOESENEDER, M. M.; WINTER, C.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, p. 159-172, 2001.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, Malden, v. 9, p. 190-198, 2008.

MORALES, S. E.; HOLBEN, W. E. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR *primer* pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by *in silico* analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2677-2683, 2009.

MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature? **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2501-2507, 1996.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, p. 351-370, 2011.

MUTHAIYAN, A.; RICKE, S. C. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 101, p. 5033-5042, 2010.

NADKARNI, M. A.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and *primers* set. **Microbiology-SGM**, Reading, v. 148, p. 257-266, 2002.

NARENDRANATH, N. V.; Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Eds.). **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. chap. 20, p. 287-298.

NARENDRANATH N. V. Bacteria beater. **Ethanol Producer Magazine**. Disponível em: <http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article_id%41070>. Acesso em 26 jan. 2010.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W.M. Effects of *lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; WOLNIEWICZ, E.; VILLA, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by *lactobacilli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 33, p. 490-493, 1990.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990. 207 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. 1995. 183 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1995.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 25-31, 1997.

OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific *primers*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 248, p. 183-187, 2005.

O'TOOLE, G. A.; STEWART, P. S. Biofilms strike back. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 1378-1379, 2005.

PARISH, M. E. Spoilage of Juices and Beverages by *Alicyclobacillus spp.* In: SAPERS, G. M.; GORNY, J. R.; YOUSEF, A. E. (Eds.). **Microbiology of fruits and vegetables**. Boca Raton: CRC Press, 2006. chap. 7, p. 159-183.

PAROLO, C. C. F. **Estudo dos lactobacilos no biofilme dental**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PEI, A. Y.; OBERDORF, W. E.; NOSSA, C. W.; AGARWAL, A.; CHOKSHI, P.; GERZ, E. A.; JIN, Z. D.; LEE, P.; YANG, L. Y.; POLES, M.; BROWN, S. M.; SOTERO, S.; DESANTIS, T.; BRODIE, E.; NELSON, K.; PEI, Z. H. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 3886-3897, 2010.

PIGGOT, R. Treatment and fermentation of molasses when making rum-type spirits. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Eds.). **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. chap. 8, p. 75-84.

POLI, A.; KAZAK, H.; GURLEYENDAG, B.; TOMMONARO, G.; PIERETTI, G.; ONER, E. T.; NICOLAUS, B. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 78, p. 651-657, 2009.

QUEVEDO, B.; GIERTSEN, E.; ZIJNGE, V.; LUTHI-SCHALLER, H.; GUGGENHEIM, B.; THURNHEER, T.; GMUR, R. Phylogenetic group- and species-specific oligonucleotide probes for single-cell detection of lactic acid bacteria in oral biofilms. **BMC Microbiology**, London, v. 11, p.14, 2011.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 3, p. 81-94, 2011.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 15, p. 115-122, 2000.

RANDAZZO, C. L.; TORRIANI, S.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; VAUGHAN, E. E. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1882-1892, 2002.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 245, p. 154-160, 1997.

RIZZON, L. A. **Sistema de produção de vinagre: fermentação acética**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/fermentacao.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

RODINI, M. A. T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol**. 1985. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

ROSALES, S.Y.R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfectantes**. 1989. 200 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1989.

SANCHEZ, J. I.; ROSSETTI, L.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A.; GIRAFFA, G. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 268-277, 2006.

SAWHNEY, R.; BERRY, V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. **Indian Journal of Medical Sciences**, Mumbai, v. 63, p. 313-321, 2009.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Montreal, v. 24, p. 250-258, 2002.

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

SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 336-341, 1979.

SHYU, C.; SOULE, T.; BENT, S. J.; FOSTER, J. A.; FOMEY, L. J. MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. **Journal of Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 562-570, 2007.

SIEVERS, M.; SWINGS, J. Genus I. *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215^{AL}. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2005. v. 2, p. 51-54.

SILVA, F. A. S. The ASSISTAT software: statistical assistance. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6., 1996, Cancun. **Anais...** St. Joseph: ASAE, 1996. p. 295-298.

SILVA, N. **Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool.** 1988. 118 f. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

SINGH, P.; ARYA, N.; TIWARI, P.; SUMAN, A.; RAI, R. K.; SHRIVASTAVA, A. K.; SOLOMON, S. Use of glutaraldehyde and benzalkonium chloride for minimizing post-harvest physio-chemical and microbial changes responsible for sucrose losses in sugar cane. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 7176-7183, 2008.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 31, p. 401-408, 2004.

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, p. 379-383, 2007.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 292, p. 107-113, 2002.

STEWART, P. S.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Biofilm antimicrobial resistance. In: GHANNOUM, M.; O'TOOLE, G.A. (Eds.). **Microbial biofilms**. Washington: ASM Press, 2004. chap. 14, p. 250-268

TEUBER, M. Genus. II. *Lactococcus*. In: BERGEY, D. H.; BOONE, D. R. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 711-722.

THIES, J. E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 579-591, 2007.

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

TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

TILBURY, R. H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J. G (Ed.). **Lactic acid bacteria in beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p. 171-177.

TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GUILLAMON, J. M.; MAS, A. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. **Food Microbiology**, London, v. 27, p. 257-265, 2010.

TRIBST, A. A. L.; SANT'ANA, A. D.; DE MASSAGUER, P. R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, New York, v. 35, p. 310-339, 2009.

TROTHA, R.; REICHL, U.; THIES, F. L.; SPERLING, D.; KONIG, W.; KONIG, B. Adaption of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 23, p. 1070-1079, 2002.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK JR, P.; FOX, G. E.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 42, p. 263-269, 1992.

YOKOYA, F. Microbiologia de Processo. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.F. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação André Tosello, 1989. p. 1-22.

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

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas spp. Fluorescens*: bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32 p. (Documentos, 127).

APÊNDICE

Apêndice A – T-RFs (em pb) gerados pelas enzimas de restrição para cada sequência do gene 16S rRNA das espécies analisadas, de acordo com as análises *in silico*.

Espécie	AluI	BstUI	DdeI	EcoRI	HaeIII	HhaI	HindIII	HinfI	MseI	MspI	RsaI	TaqI
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	210	97	16	612	71	176	1445	300	41	441	424	402
<i>Acetobacter tropicalis</i>	143	97	16	612	71	176	1447	103	41	441	424	203
<i>Bacillus cereus</i>	74	237	16	676	311	579	1509	338	68	147	488	55
<i>Bacillus pumilus</i>	73	235	16	673	309	240	1506	336	592	81	485	55
<i>Bacillus licheniformis</i>	73	236	16	675	310	241	1507	337	594	145	457	55
<i>Bacillus subtilis</i>	73	235	16	674	309	240	1507	336	593	145	486	55
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	73	235	16	674	309	240	1507	336	593	145	486	55
<i>Clostridium beijerinckii</i>	237	226	16	639	300	1071	1469	327	41	520	451	55
<i>Clostridium sp.</i>	66	225	16	638	299	1071	1471	326	154	519	450	54
<i>Enterobacter sp.</i>	74	393	16	665	39	371	1497	328	454	494	425	55
<i>Gluconacetobacter sp.</i>	143	97	16	612	229	176	1446	300	41	441	424	203
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	209	251	16	1521	246	596	1521	377	634	181	907	55
<i>Lactobacillus buchneri</i>	273	61	16	1531	336	606	1531	388	70	580	917	55
<i>Lactobacillus casei</i>	232	254	313	1527	328	599	1527	93	147	573	910	55
<i>Lactobacillus fermentum</i>	273	61	16	1533	67	406	1533	388	223	29	918	55
<i>Lactobacillus paracasei</i>	232	254	16	1527	328	599	1527	93	147	573	910	55
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	232	254	16	1527	328	599	1527	93	147	573	910	55
<i>Lactobacillus plantarum</i>	213	253	16	1524	327	598	1524	379	459	572	909	55
<i>Lactobacillus plantarum</i>	264	253	16	1524	327	598	1524	379	459	572	909	55
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	455	236	16	1508	266	209	1005	362	200	555	486	55
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	455	236	16	1508	266	209	1005	362	200	555	486	55
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	74	236	16	674	310	238	1120	337	593	155	486	55
<i>Weissella cibaria</i>	87	264	16	1534	338	609	1534	390	227	583	920	55

Apêndice B – Relação completa das espécies possivelmente contaminantes das amostras da primeira coleta, obtida através das análises de T-RFLP.

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Acaryochloris marina</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acaryochloris sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acetobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acetobacteraceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidiphilium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidocella sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidovorax cattleyae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidovorax citrulli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidovorax delafieldii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidovorax ebreus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Acidovorax sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter genomosp</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter junii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter septicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Actinobacillus genomosp</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Actinomadura sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Actinomyces sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Actinomyces viscosus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Actinopolyspora sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Ajfifella marina</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Afipia genosp</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Agrobacterium albertimagni</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Agrobacterium sanguineum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Agrobacterium sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Alcaligenes sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Alteromonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Anabaena solitaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Anabaena sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Anaerococcus tetradius</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Anaeromyxobacter sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Ancylobacter rudongensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ancylobacter sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1

(continua)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Anoxybacillus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Arenibacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Arthrobacter ardleyensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Arthrobacter aurescens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Arthrobacter globiformis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Arthrobacter scleromae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Arthrobacter sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Azospirillum brasilense</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillaceae bacterium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus akibai</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	3
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Bacillus clausii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillus halodurans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus pumilus</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	3
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	5
<i>Bacillus stratosphericus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Bacillus tianmuensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacteroides rodentium</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Bacteroidetes bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacteroidetes endosymbiont</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Beijerinckia fluminensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bifidobacterium longum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bisgaard Taxon</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Blastochloris sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bosea eneae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bosea minatitlanensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bosea sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Brasilonema bromeliae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Brasilonema octagenarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Brochothrix sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	3
<i>Bulleidia moorei</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1

(continuação)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia gladioli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia glumae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia multivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia tropica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia unamae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia xenovorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderiaceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Capnocytophaga sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Carboxydibrachium pacificum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Carnobacterium sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Catenulispora acidiphila</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Cellulomonas sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Chitinibacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Chitinimonas taiwanensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Chromobacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Clostridium nexile</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Clostridium ramosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Clostridium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Collimonas fungivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Colwellia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Comamonas sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Comamonas testosteroni</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Corynebacterium durum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Corynebacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Croceibacter atlanticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Cryomorphaceae bacterium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Cupriavidus necator</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Cyanobium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Cylindrospermum sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1

(continua)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Cytophaga sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Dechloromonas aromatica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Dechloromonas sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Dehalobacter sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Delftia acidovorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Delftia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Desulfatiferula olefinivorans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Desulfatimicrobium mahresensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Desulfofrigus fragile</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Desulfotomaculum hydrothermale</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Desulfotomaculum putei</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Desulfovibrio sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Desulfurivibrio alkaliphilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Devosia neptuniae</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Devosia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Diaphorobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Enterococcus asini</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus avium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus mundtii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Erythrobacter litoralis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Erythrobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Eubacterium brachy</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Eubacterium eligens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Eubostrichus topiarius</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Exiguobacterium sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Finegoldia magna</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Flavobacterium sp.</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	3
<i>Flexibacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Flexithrix dorotheae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Frankia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Frateuria sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Fusibacter paucivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geitlerinema sp.</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	2

(continuação)

Espécie	Amostras da primeira coleta									Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN		
<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geobacillus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Glaciecola sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Gluconacetobacter saccharivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Gluconobacter oxydans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Granulibacter bethesdensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Halobacillus dabanensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Halobacillus karajensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Halobacillus litoralis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Halobacillus profundus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Halobacillus sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	2
<i>Halobacillus trueperi</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Halomonas aquamarina</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Halomonas salina</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	2
<i>Halomonas sp.</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	7
<i>Halomonas variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Halorhodospira halophila</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
<i>Helicobacter kirbridei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Helicobacter peregrinus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Helicobacter pullorum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hoeflea alexandrii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hoeflea sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hydrogenophaga atypica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hydrogenophaga defluvii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hyphomicrobiaceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Iodobacter fluvialis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Iodobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Jannaschia rubra</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Jannaschia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Janthinobacterium lividum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Janthinobacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Jonesia denitrificans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Jonesia sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Kocuria sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Kurthia gibsonii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Labrenzia aggregata</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Labrenzia alba</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1

(continua)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Labrenzia</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Labrys wisconsinensis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus buchneri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus capillatus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus crustorum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus farciminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	4
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	6
<i>Lactobacillus kefir</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	5
<i>Lactobacillus kisonensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	6
<i>Lactobacillus mobilis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus mucosae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus nantensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	4
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	5
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	3
<i>Lactobacillus rapi</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	3
<i>Lactobacillus reuteri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Lactobacillus similis</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	3
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+	7
<i>Lactobacillus</i> sp. rennanqilfy	-	-	-	+	+	+	-	+	4
<i>Lactobacillus sunkii</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	4
<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	4
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Lactococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Legionella longbeachae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Leptothrix cholodnii</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Leptothrix mobilis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2

(continua)

(continuação)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Limnobacter thiooxidans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lyngbya sp.</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Magnetospirillum magneticum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Magnetospirillum sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Mahella australiensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Malikia granosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Mannheimia glucosida</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Mannheimia granulomatis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Mannheimia ruminalis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Mannheimia sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Mannheimia varigena</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Maorithyas hadalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Maribacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Maricaulis virginensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter bryozoorum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter gudaonensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter lutaoensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marteella mediterranea</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Massilia plicata</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Massilia timonae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Mesorhizobium ciceri biovar biserrulae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Mesorhizobium loti</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Mesorhizobium sp.</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Methylidium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylobacteriaceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylobacterium extorquens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylobacterium populi</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylobacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylocystis sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylopila sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylosulfonomonas methylovora</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Methylotenera mobilis</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Methyloversatilis sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Microbacterium oleivorans</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	3

(continua)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Micrococcaceae bacterium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Modicisalibacter tunisiensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	2
<i>Moraxellaceae bacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Mycobacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Myroides sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Negativicoccus succinicivorans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Nesiotobacter sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Nitrosomonas europaea</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Nitrosomonas sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Nitrospira multiformis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nitrospira enrichment</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Nitrospira sp.</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Nocardiopsis sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nodularia sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nodularia spumigena</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nordella oligomobilis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc azollae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc commune</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc flagelliforme</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc punctiforme</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc sp. Pannaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc sp. Pseudocypbellaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nostoc sp. Psudocypbellaria</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Novosphingobium subterraneum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Oceanibaculum indicum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Oceanicola nanhaiensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi subsp. oncorhynchi</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Oceanobacillus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Ochrobactrum tritici</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Olavius algarvensis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ornithinibacillus bavariensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Ornithinibacillus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Oxalobacteraceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pandoraea sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Paracoccus sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pasteurella multocida subsp. tigris</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2

(continua)

(continuação)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Pediococcus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Pedobacter terrae</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Pelosinus sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pelotomaculum sp.</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	6
<i>Peptococcaceae bacterium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Peptoniphilus sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phaeobacter arcticus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phormidium murrayi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Phyllobacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phytoplasma sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Planifilum fulgidum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Planifilum yunnanense</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Polaromonas sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Porphyrobacter neustonensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Porphyrobacter sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Prauseria sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Prevotella copri</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Prevotella disiens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Prevotella intermedia</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	3
<i>Prevotella marshallii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Prevotella oralis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Prevotella sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Rhizobiaceae bacterium</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Rhizobium sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Rhizobium vitis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Rhodococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Rothia dentocariosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	3

(continua)

Espécie	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Rothia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Ruminococcus obeum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Salegentibacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Salimicrobium album</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Salinicoccus roseus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Salinicoccus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Salinicola salarius</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	2
<i>Scytonema sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Serratia nematodiphila</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Serratia sp.</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	3
<i>Shewanella sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Sinorhizobium sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Solobacterium moorei</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Sorangium cellulosum</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Sphingobacterium faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Sphingobacterium siyangense</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Sphingobacterium siyangensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Sphingobacterium sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Sporotalea propionica</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Starkeya novella</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Starkeya sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptacidiphilus neutrinimicus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus equinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus phocae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus sobrinus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Syntrophobotulus glycolicus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Syntrophomonas erecta</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Syntrophomonas erecta subsp. sporosyntropha</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Syntrophomonas sporosyntrophas</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Terribacillus saccharophilus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter brockii subsp. finnii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	2
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1

(conclusão)

<i>Espécie</i>	Amostras da primeira coleta								Freq.
	MEL	BH2O	MST	PC	VINHO	BT	BD	BCEN	
<i>Thermus yunnanensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Thioalkalivibrio sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Thiothrix sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Vagococcus carniphilus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Vagococcus elongatus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Vagococcus penaei</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Vagococcus sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Verrucomicrobia bacterium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	2
Número total de espécies	46	177	22	17	161	32	11	98	

As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.

Apêndice C – Relação completa das espécies possivelmente contaminantes das amostras da segunda coleta, obtida através das análises de T-RFLP.

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Acetobacter estunensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Acetohalobium arabaticum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Achromobacter denitrificans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Achromobacter sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Achromobacter xylosoxidans subsp. xyloso</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Acidovorax delafieldii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Acidovorax sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Alcaligenaceae bacterium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Alcaligenes sp.</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. ritmannii</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus ferripilum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+	5
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Alkalibacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Aminomonas aminovorax</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Anaerobacter polyendosporus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Anaerococcus prevotii</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	5
<i>Anoxybacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Arhodomonas sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Azoarcus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillaceae bacterium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus acidicola</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Bacillus aidingensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Bacillus akibai</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus alcalophilus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus algicola</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7

(continua)

(continuação)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Bacillus anthracis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Bacillus aquimaris</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillus badius</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Bacillus baekryungensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus beijingensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus caldolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus caldotenax</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus cereus biovar anthracis</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	-	4
<i>Bacillus cereus subsp. cytotoxis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus circulans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus clausii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus coagulans</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5
<i>Bacillus endophyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus firmus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus flexus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus gibsonii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus ginsengi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus hackensackii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus horikoshii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus isronensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus koreensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus lehensis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	7
<i>Bacillus lentus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus macroides</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus mannanilyticus</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Bacillus massiliensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus methanolicus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus mojavensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus nealsonii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus oleronius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus psychrodurans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus samanii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bacillus senegalensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9

(continua)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Bacillus simplex</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus smithii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Bacillus thuringiensis serovar finitimus</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	5
<i>Bacillus thuringiensis serovar konkukian</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	5
<i>Bacillus tipchiralis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	3
<i>Bacillus vortex</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Bordetella sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Bulleidia moorei</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia ferrariae</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia fungorum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	4
<i>Burkholderia gladioli</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia glumae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia lata</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia mallei</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Burkholderia multivorans</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia phymatum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Burkholderia sartisoli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Burkholderia silvatlantica</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia sp.</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia thailandensis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Burkholderia tropica</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia unamae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Burkholderia xenovorans</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Burkholderiaceae bacterium</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Burkholderiales bacterium</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp. ten</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9

(continuação)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp. yon</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Caloramator australicus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Caloramator indicus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Caloramator uzoniensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Campylobacter rectus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Carboxydibrachium pacificum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Caryophanon sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Chitinimonas taiwanensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Chlorobium limicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Chlorobium luteolum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Chromobacterium sp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Chromobacterium violaceum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Chryseobacterium shigense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Clostridiaceae bacterium</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Clostridiales bacterium</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Clostridium 16SX-1</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Clostridium 16SX-2</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Clostridium aminophilum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Clostridium botulinum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Clostridium gasigenes</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Clostridium kluyveri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Clostridium ramosum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Clostridium sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Clostridium spiroforme</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	3
<i>Clostridium subterminale</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Cohnella phaseoli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Comamonas sp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Conexibacter woesei</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Corethron pennatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Cupriavidus necator</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Cupriavidus pauculus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Cyclohexane degrading</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Cymatopleura solea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Cymbella suburgidula</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Dechloromonas aromatica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Dechloromonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Deferribacter desulfuricans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Deferribacter thermophilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Dehalobacter sp.</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	5

(continua)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+	6
<i>Desulfitobacterium sp.</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+	6
<i>Desulfocurvus vexinensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Desulfonauticus submarinus</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	+	6
<i>Desulfotomaculum putei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Desulfovibrio sp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Enterococcus asini</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	3
<i>Enterococcus dispar</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	3
<i>Enterococcus durans</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Enterococcus faecium</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Enterococcus mundtii</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	7
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5
<i>Eubacterium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Eubostrichus toparius</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Fibrobacter succinogenes subsp. succinog</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	7
<i>Flexispira rappini</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Flexispira sp.</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Frateuria sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Fucus vesiculosus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Fusibacter paucivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Gallionella capsiferriformans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Geitlerinema sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Geobacter lovleyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geobacter metallireducens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Geothermobacterium ferrireducens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Halobacillus litoralis</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	+	6
<i>Halobacillus sp.</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Halomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Halorhodospira halophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Helicobacter acinonychis</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Helicobacter apodemus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	4
<i>Helicobacter ganmani</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	4
<i>Helicobacter hepaticus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Helicobacter muridarum</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Helicobacter mustelae</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Helicobacter pametensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Helicobacter pullorum</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Helicobacter pylori</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Helicobacter sp.</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8

(continuação)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Herbaspirillum sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Hydrocarboniphaga effusa</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	7
<i>Hydrocarboniphaga sp.</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	6
<i>Hydrogenophaga atypica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Hydrogenophaga defluvii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Hydrogenophaga sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Janthinobacterium sp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Jeotgalicoccus huakuii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Kurthia gibsonii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	3
<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus crispatus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Lactobacillus ingluviei</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Lactobacillus kefiri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus kisonensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus mucosae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus nantensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lactobacillus otakiensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	7
<i>Lactobacillus rapi</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus reuteri</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactobacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactobacillus sunkii</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Lactococcus garvieae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Lactococcus piscium</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	6
<i>Lactococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Laribacter hongkongensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Leptospirillum sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Leptothrix cholodnii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Leptothrix mobilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9

(continua)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Leptothrix sp.</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Limnobacter thiooxidans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Macrocooccus brunensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Mahella australiensis</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Malikia granosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Marichromatium sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	2
<i>Mariprofundus ferrooxydans</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	5
<i>Meiothermus rosaceus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	3
<i>Meiothermus ruber</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Meiothermus sp.</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Meiothermus taiwanensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Melosira varians</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Methylibium sp.</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Methylobacterium komagatae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Methylophaga aminisulfidivorans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	3
<i>Methylotenera mobilis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Mogibacterium timidum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Moorella sp.</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	-	5
<i>Moorella thermoacetica</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	-	5
<i>Mycoplasma zalophi</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Neisseria sp.</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5
<i>Nitrosomonas europaea</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Nitrosomonas sp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	4
<i>Nitrospira multiformis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Odontella sinensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2
<i>Olavius algarvensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Olavius algarvensis sulfur-oxidizing end</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Olavius crassitunicatus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>Orientia tsutsugamushi str Boryong</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Orientia tsutsugamushi str Ikeda</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Ornithinibacillus sp.</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Ottowia thiooxydans</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Oxalobacteraceae bacterium</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+	3
<i>Paenibacillus abekawaensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Paenibacillus castaneae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Paenibacillus hunanensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2

(continua)

(continuação)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Paenibacillus sabiniae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Paenibacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	7
<i>Paenibacillus stellifer</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Paenibacillus zanthoxyli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Pandoraea sp.</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Patulibacter minatonensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
<i>Pediococcus cellicola</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
<i>Pelobacter propionicus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Pelosinus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Pelotomaculum sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Peptococcaceae bacterium</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	5
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Planifilum fulgidum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Planifilum yunnanense</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Planococcus maritimus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Planococcus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Planomicrobium chinense</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	3
<i>Polaromonas sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Porphyrobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	3
<i>Pseudanabaena sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2
<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas corrugata</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas flavescens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas fulva</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas graminis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas indica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas japonica</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas jessenii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas lini</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas lurida</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1

(continua)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Pseudomonas lutea</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas migulae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas otitidis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas poae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas synxantha</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas trivialis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pseudomonas veronii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Psychrobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pusillimonas sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ralstonia detusculanense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Ralstonia pickettii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Ralstonia solanacearum</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5
<i>Ralstonia sp.</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Rhodanobacter terrae</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2
<i>Rhodococcus equi</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	4
<i>Rhodoferax sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Robbea sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Rubrivivax sp.</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	7
<i>Salinicoccus kekensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3
<i>Sedimentibacter sp.</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	4
<i>Selenomonas ruminantium</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Sinobacter flavus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Slackia piriformis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5
<i>Solibacillus sp.</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Solobacterium moorei</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Sporacetigenium mesophilum</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	4
<i>Sporosarcina sp.</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	3
<i>Sporotalea propionica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9

(continuação)

Espécie	Amostras da segunda coleta									Freq.
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Staphylococcus arlettae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus carnosus subsp. carnosus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus carnosus subsp. utilis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus condimenti</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus croceolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus equorum subsp. equorum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus hominis subsp. hominis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus pseudodolugdunensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus sciuri subsp. sciuri</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Staphylococcus succinus subsp. succinus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7
<i>Stephanopyxis nipponica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus cristatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dentapri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dentirousetii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus didelphis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus downei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgal</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus equi subsp. equi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus equinus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus ferus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. gallol</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. macedo</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus iniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus macacae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Streptococcus mitis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8

(continua)

Espécie	Amostras da segunda coleta									
	2MEL	2BH2O	2MST	2PC	2PCT	2VINHO	2BT	2BD	2BCEN	
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus orisuis</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	4
<i>Streptococcus parauberis</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	4
<i>Streptococcus phocae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus pyogenes str. Manfredo</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Streptococcus sobrinus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Streptococcus sp.</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	4
<i>Streptococcus uberis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Streptococcus ursoris</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	5
<i>Streptomyces sp.</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2
<i>Synergistetes bacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7
<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Thermoactinomycetaceae bacterium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8
<i>Thermoanaerobacter brockii subsp. finnii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter italicus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter mathranii subsp. math</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Thermoanaerobacter uzonensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8
<i>Thermosyntropha sp.</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	5
<i>Thermus sp.</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	5
<i>Thermus yunnanensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Thioalkalivibrio sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Thiothrix sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
<i>Verrucomicrobia bacterium</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Vibrio sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2
<i>Virgibacillus proomii</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Virgibacillus sp.</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	7
<i>Wautersia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6
<i>Weissella confusa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6
<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Weissella sp.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
<i>Wolinella succinogenes</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
Número total de espécies	290	314	222	192	197	238	176	165	259	

As amostras estão ordenadas de acordo com a sequência de ocorrência dentro do processo de fermentação.