

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM SAÚDE PÚBLICA  
DOUTORADO EM PALEOPARASITOLOGIA.

**"Paleoparasitologia: Estudos associados à recuperação de organismos bacterianos de esporos viáveis presentes em coprólitos sul-americanos".**

JOSELI MARIA DA ROCHA NOGUEIRA

Sob a orientação dos Professores

Dr. Luiz Fernando Rocha Ferreira da Silva

&

Dr. Ernesto Hofer

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação  
Stricto Sensu da Escola Nacional de Saúde  
Pública Sérgio Arouca para obtenção do título  
de Doutor em Ciências na área de Saúde  
Pública.

Rio de Janeiro

30 de junho de 2008

Aprovada pela Banca Examinadora em 30 de junho de 2008

Banca examinadora:

Titulares:

*Pedro Paulo Chieffi*

*Léa Ferreira Camillo Coura*

*Adauto Jose Gonçalves de Araújo*

*Valmir Laurentino Silva*

Suplentes:

*Adeilton Alves Brandão*

*José Roberto Machado e Silva*

## Ficha catalográfica

Nogueira, Joseli Maria da Rocha

Paleoparasitologia: Estudos associados à recuperação de organismos bacterianos de esporos viáveis presentes em coprólitos sul-americanos / Joseli Maria da Rocha Nogueira – Rio de Janeiro, 2008.

141 p.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2008.

1. Coprólito. 2. Esporos. 3. Cultura. 4. Clonagem. 5. Bacillaceae.

## BIOGRAFIA

Joseli Maria da Rocha Nogueira, filha de José Rocha Costa e Lidia Kolb da Rocha Costa, nascida em 11 de junho de 1964, natural do Rio de Janeiro, RJ.

Ingressou na Universidade Santa Úrsula, no Curso de Ciências Biológicas, em 1983, graduando-se como Bacharel e Licenciada em 1986.

Em 1990, ingressou em curso de Pós-Graduação em nível de especialização, "Lato-sensu" em Microbiologia e Imunologia da Faculdade SOBEU, Barra Mansa, RJ., onde se formou em 1991.

Em 1992, foi bolsista do CNPq durante estágio no Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz desenvolvendo o projeto: "Pesquisa de *V.cholerae* O1 em pacientes portadores de processos entéricos agudos".

Em 1993, iniciou suas atividades como contratada do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas, IOC, FIOCRUZ. A partir desta data, ministrou aulas nos cursos Técnicos e de Mestrado em Biologia Parasitária na mesma instituição, participando também de diferentes projetos.

Em 1994, ingressou no curso de Pós-Graduação ao nível de Mestrado em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, obtendo o título em 1996.

Em 1997, foi aprovada em 1º lugar no concurso público para professora Assistente Substituta da Disciplina de Microbiologia e Imunologia Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, onde atuou até 1998.

Em 1998, foi aprovada em 1º lugar no concurso público para Tecnologista Pleno I, na área de Microbiologia - Laboratório de Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz - Ministério da Saúde e integrou a equipe do Centro de Referência Nacional para Leptospirose, Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Bacteriologia do IOC – FIOCRUZ, até 2003, quando, aprovada no curso de Pós-graduação ao nível de Doutorado em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, transferiu-se para o Departamento de Ciências Biológicas DCB-ENSP, passando a realizar suas pesquisas no Laboratório de Paleoparasitologia.

Atualmente além da atuação no referido laboratório como curadora da coleção de coprólitos, é também Chefe do setor de Microbiologia do Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública do Departamento de Ciências Biológicas, ENSP-FIOCRUZ.

Aos meus orientadores, ambos importantes na minha caminhada Profissional.  
E a minha mãe, que me ensinou a paciência e a perseverança.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho deve muito a algumas pessoas e instituições, por diferentes razões, e eu gostaria de agradecer especialmente:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando Rocha Ferreira da Silva – DCB-ENSP, que aceitou compartilhar comigo não só seu tema de pesquisa, sendo um interlocutor disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por ser paciente e generoso e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

Ao meu eterno orientador, Prof. Dr. Ernesto Hofer - IOC, pela dedicação incansável em todos estes anos de convívio harmônico, por ter me ensinado as bases da pesquisa em bacteriologia e me ajudado sempre, desde os meus primeiros passos nesta instituição até este meu doutorado, atuando muitas vezes não só como mestre, e patrocinador da pesquisas, mas como um grande amigo e ouvinte atento a todas às minhas dificuldades profissionais e sociais. Por sua sabedoria em direcionar minhas expectativas, sugerindo a ENSP como instituição para meu doutorado e indicar o Dr. Luiz Fernando como orientador principal, pelas excelentes sugestões oferecidas, seu carinho e apoio sempre presentes.

Ao Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo – DENSP - ENSP, por ter instigado meu interesse pelas questões da Paleoparasitologia, dividindo comigo seus conhecimentos, e por sua incrível generosidade em me acolher, disponibilizando dados e outras fontes de informação, provendo suporte financeiro para realização dos meus experimentos, auxiliando na revisão dos meus escritos, por suas críticas construtivas durante o exame de qualificação e todo percurso da tese. Agradeço por sua grande amizade.

Ao Doutores Octávio Fernandes da Silva Filho e Adeílton Alves Brandão - IOC, que permitiram a realização de minha pesquisa no seu laboratório para a prática dos experimentos de biologia molecular, mas sobretudo ao Dr. Adeílton, que não só me ofereceu as suas instalações no Instituto Oswaldo Cruz, mas que orientou-me nesta ciência aonde eu era apenas uma aprendiz iniciante. Também agradeço a ele o

direcionamento sugerido no exame de qualificação, juntamente com muitas outras sugestões, exemplos e críticas fundamentais à reelaboração e aprimoramento da abordagem que eu vinha fazendo de meu tema, por toda sua dedicação e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Leon Rabinovich, Dra. Clara de Fátima Gomes Cavados, e em especial à Bióloga Mestre em Biologia Celular e Molecular, Jeane Quintanilha Alves, integrantes do Laboratório de Fisiologia Bacteriana e do Centro de Referência Nacional para Carbúnculo - LARENAC do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ por seu fundamental apoio na realização das provas bioquímicas para identificação clássica das amostras isoladas dos coprólitos.

Ao Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva, amigo e colega no DCB, por seu incentivo desde a época do nosso mestrado, incluindo sua prestimosa ajuda na correção do meu projeto de tese. Sua disponibilidade em me auxiliar na escolha dos testes sorológicos e na realização dos mesmos foi essencial no aprendizado destas técnicas e nas conclusões sobre esses resultados.

À Prof. Dra. Elizabeth Gloria Oliveira Barbosa dos Santos, Chefe do departamento de Ciências Biológicas, por seu companheirismo e ajuda no início da minha tese, sua amizade e compreensão quanto as minhas ausências do departamento durante a realização da mesma.

À Dra. Adriana Hamond Régua Mangia por seu gentil oferecimento em testar o material extraído dos coprólitos para verificar a presença de *E.coli* e suas sugestões ao projeto antes do envio à comissão de ética.

A Wagner Thadeu Cardoso Esteves, não como biólogo e bacteriologista, mas como companheiro querido e paciente, por partilhar comigo todo o processo de produção da tese, desde o projeto de pesquisa, até muitas vezes ajudante prático, sendo minha mais importante fonte de apoio, sem o qual certamente esta tese não chegaria ao fim.

Aos queridos amigos, Elisabeth Santos, Maria Inês Rossi, Maria Esther Ricci, Simone Santos, Tainah Galdino de Paula, e demais colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas – IOC, que me apoiaram em todos os momentos em que lá estive, ora me auxiliando no aprendizado das técnicas, ora sugerindo novas Metodologias.

Ao colega e amigo Dr. Dario Eluan Kalume, pela amizade e prestimosa colaboração na sugestão de testes de validação de não contaminação contemporânea nas amostras e na tradução dos artigos para a língua inglesa.

A minha monitora, estagiária e amiga Lucianne Morais Mota Lima que gentilmente auxiliou na organização final das amostras e das fotografias dos géis, desempenhando também a duplicação de experimentos básicos realizados em outro laboratório, principalmente o teste com o coprólito experimental.

A amiga Lucieny de Faria Souza pela amizade, apoio e estímulo no final da tese.

A Plataforma Genômica da FIOCRUZ na pessoa amiga de Aline Moraes, sempre disposta a ajudar aos colegas. Pelo seu auxílio na análise das bandas provenientes dos plasmídios e no sequenciamento de minhas amostras.

Aos colegas Licurgo Augusto Neto e Mariza Moraes de Oliveira, pelo apoio durante os longos períodos de minha ausência do Laboratório e ao Ary do Carmo, que se agregou a nós recentemente, fortalecendo a nossa equipe no setor de Microbiologia - DCB.

A Natalina Jordão de Oliveira, secretária e colega do Laboratório de Paleoparasitologia pelo seu carinho bem como à Tânia, Rogéria, Isabel, Rosa e Fabiano da Secretaria do DCB pelo apoio administrativo no âmbito do Departamento.

Aos professores e colegas de pós-graduação da ENSP, pelo convívio agradável.

A SECA e a Coordenação de Pós-graduação, especialmente a Maria Cecília Gomes.

A ENSP, ao DCB e ao DENSP.

Ao CNPq.

A minha mãe, que sempre me estimulou a estudar e me ajudou dando todo apoio que podia e principalmente por permitir que eu estivesse aqui neste momento, neste planeta...

A todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram a chegar até aqui, muito obrigado...



**“Quem nunca errou nunca experimentou nada novo”**

**“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”**

Albert Einstein

## RESUMO

Com base na idéia de que esporos bacterianos são estruturas extremamente resistentes, fomos capazes a partir da utilização de várias técnicas de cultivar e identificar de coprólitos humanos e animais, datados entre  $3490 \pm 120$  a  $430 \pm 70$  anos, recuperados de escavações arqueológicas no Brasil, bactérias da família *Bacillaceae*. Os coprólitos inicialmente foram tratados com radiação ultravioleta com o objetivo de eliminar possíveis contaminantes externos e posteriormente perfurados assepticamente para retirada de material da porção mais interna. Esse material foi então cultivado em diferentes meios de cultura, possibilitando o isolamento de bastonetes Gram positivos. Esses microorganismos foram então submetidos a reações bioquímicas clássicas e a técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a clonagem e o seqüenciamento gênico. A análise de todos os dados possibilitou não somente concluir que se tratavam de representantes da família *Bacillaceae*, mas em alguns casos definir o gênero e a espécie mais provável, demonstrando que estas metodologias conjugadas permitem este grau de definição e que será possível no futuro um estudo mais minucioso da microbiota antiga associada a este material.

Palavras-chave: Paleoparasitologia, coprólito, esporos, cultura, clonagem, Bacillaceae

## ABSTRACT

Based on the idea that bacterial spores are very resistant structures, we were able to cultivate and identify species from the Bacillaceae family found in ancient human and animal coprolites dated between  $3490 \pm 120$  to  $430 \pm 70$  years by using various molecular biology techniques. The coprolites recovered from archaeological digs in Brazil, were initially treated with ultraviolet radiation in order to eliminate possible external contaminants, followed by aseptic drilling to carefully collect sample located in the innermost portion. This material was then grown in different culture media, allowing the isolation of Gram positive bacilli. These microorganisms were then subjected to conventional biochemical tests and molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR), cloning and gene sequencing. The analysis of all data enabled us to conclude that the isolated bacteria found in the coprolite belonged to the Bacillaceae family. Moreover, in some cases we could classify the most likely genus and species. The combined methodologies used in this work prove to be a valuable approach to investigate and recover ancient spore bacteria. Thus, it will be possible a further characterization of ancient microbiota related to these coprolites.

Keywords: Paleoparasitology, coprolite, spores, culture, cloning, Bacillaceae

## SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão	5
4. Material e Métodos	17
5. Resultados	46
6. Discussão	59
7. Conclusões	68
8. Perspectivas	70
9. Referências Bibliográficas	71

## Lista de ilustrações:

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 01 - Mapas de localização e ilustração referentes ao Deserto de Atacama – Chile	17
Figura 02 - Ilustração e Mapas de localização referentes a Serra da Capivara – São Raimundo Nonato - Piauí – Brasil	18
Figura 03 - Mapas de localização do Município Unaí - Minas Gerais – Brasil e ilustração referente ao sítio Gruta do Gentio II nesta mesma localidade	18
Figura 04 - Aspectos morfológicos e dimensão de coprólitos variados	20
Figura 05 - Retirada do material do coprólito através de perfuração asséptica	22
Figura 06 - ELISA - Exemplo de leitura visual de resultados positivos	25
Figura 07 - ELISA - Exemplo de visualização de resultados positivos através do aparelho leitor ótico	25
Figura 08 - Reprodução artificial de coprólitos em moldes em argila mantidos em estufa a 37°C para secagem	26
Figura 09 - Topo TA utilizado na experimentação da clonagem	38
Figura 10 - Fluxograma das Etapas da Clonagem Gênica Plasmidial	43
Figura 11 - Revelação do gel das amostras isoladas resultante da PCR com os Primers rpoB1 e rpoB2	51
Figura 12 - Gel da PCR, das amostras isoladas, com os primers EWA-1 e EWA-2.	51
Figura 13 - Gel do comportamento das amostras com os primers GRP-1 e GRP-2.	52
Figura 14 - Perfil das amostras submetidas aos primers universais (29F/98R e 338F/531R)	52
Figura 15 - Géis do material da extração e purificação dos plasmídios provenientes da reação com produtos da PCR realizada com os iniciadores rpoB1 e rpoB2.	53
Figura 16 - Gel do material da extração e purificação dos plasmídios provenientes dos clones transformados com vários produtos da PCR (mix) e também com os iniciadores EWA-1 e EWA-2.	54
Figura 17 - Géis do material da extração e purificação dos plasmídios dos clones transformados com vários produtos da PCR (mix).	55
Figura 18 - Qualidade e comprimento das seqüências obtidas através da plataforma genômica (valor geral e do último seqüenciamento)	55
Figura 19 - Dendrograma demonstrando a similaridade entre os <i>Bacillus</i> sp. isolados baseado nos dados da caracterização bioquímica gerado usando o coeficiente de similaridade simples e o algoritmo aritmético não ponderado de agrupamento aos pares.	61
Figura 20 - Separação eletroforética em gel a 1% de agarose da extração direta do material do coprólito 1216a, negativo no isolamento bacteriano por cultivo	62

## Lista de Tabelas:

<b>Tabelas</b>	<b>Página</b>
Tabela 01 - Relação das amostras selecionadas através do banco de dados e seus detalhes	19
Tabela 02 - Primers usados para PCR neste estudo:	32
Tabela 03 - iniciadores utilizados para amplificação através da PCR que originaram os produtos clonados analisadas no sequenciamento	44
Tabela 04 - Amostras de coprólitos que revelaram crescimento em meios líquidos e sólidos com os respectivos números de colônias isoladas	47
Tabela 05 - Sumário dos resultados citomorfológicos das amostras isoladas	49
Tabela 06 - Características fenotípicas das cepas de <i>Bacillus</i> sp. isoladas.	50

## Lista de Anexos:

<b>Anexos</b>	<b>Página</b>
Anexo 01 - Grau de similaridade obtido pelo BLAST, alinhamento e dendrograma das seqüências obtidas de acordo com o primer encontrado	87
Anexo 02 - Seqüência completa do gene rpoB mostrando os nucleotídeos divergentes	140

## 1. INTRODUÇÃO:

A paleoparasitologia tem como objetivo primário o reconhecimento de agentes etiopatológicos que provavelmente afetaram nossos ancestrais, recorrendo a técnicas fenotípicas e genotípicas, permitindo assim traçar uma melhor compreensão das possíveis doenças e problemas de natureza epidemiológica que ocorreram no passado. Na investigação do processo saúde-doença dos povos antigos, esta disciplina possibilita descobrir vestígios de hábitos e costumes, bem como, detectar diferentes formas de infecção.

O diagnóstico de doenças em populações extintas pode ser pesquisado, com base em diversos parâmetros, considerando sinais de anormalidade em registros ósseos, e até mesmo marcadores biológicos, como o caso de ovos de parasitos detectados em coprólitos (Duarte *et al*<sup>1</sup>).

Os coprólitos (gr. copros = fezes; litos = pedra) que servem de vasta fonte para essas pesquisas, são fezes conservadas naturalmente pela dessecação ou mineralização, que mantém muitas vezes vestígios físicos ou mesmo moleculares de organismos que estiveram presentes nos intestinos dos indivíduos ou animais que os originaram (Araújo & Ferreira<sup>2</sup>).

Até pouco tempo, o estudo dos coprólitos estava limitado à pesquisa de helmintos, deixando uma grande lacuna no que se refere a grupos de organismos bastante numerosos como os protozoários e as bactérias.

Com o incremento do estudo da paleoparasitologia pela biologia molecular e a análise de interações sorológicas com anticorpos monoclonais, abriu-se uma nova possibilidade para pesquisa de organismos não detectáveis pela pesquisa direta de vestígios, tendo como pioneiros nestes estudos a pesquisa dos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp.. As novas técnicas possibilitaram sustentar a afirmação de que a paleoparasitologia seja definida como ciência da interdisciplinaridade, permitindo em tese, também a pesquisa de organismos não considerados possíveis anteriormente, como por exemplo, as bactérias (Araújo *et al*<sup>3</sup>, Pääbo<sup>4</sup>).

Iñiguez<sup>5</sup> em 1998 demonstrou a possibilidade real de recuperação de DNA bacteriano, através da técnica da PCR, de fezes artificialmente dessecadas, conseguindo reaver após inoculação de *Vibrio cholerae* e *Bacillus sphaericus*, material genético identificável destes microorganismos. A mesma pesquisadora, através da técnica de RAPD-PCR, conseguiu recuperar seqüências intactas de DNA de *Shigella flexneri* de coprólitos ancestrais.

Considerando a possibilidade desta detecção e a importância do desenvolvimento desta técnica para futuros estudos, surge a idéia da paleobacteriologia, buscando uma identidade correspondente ao estudo parasitológico, porém em relação aos organismos bacterianos.

Ao nos referirmos às bactérias possivelmente presentes em coprólitos, não podemos deixar de pensar em grupos bacterianos atualmente encontrados de forma natural ou freqüente em materiais de origem fecal, como por exemplo, os membros das famílias *Enterobacteriaceae* e *Bacillaceae*.

A primeira família, congregando gêneros de inegável importância dentro deste contexto, como *Escherichia coli*, *Salmonell*, e *Shigella* entre outros e a segunda família de maior probabilidade de detecção pela formação de endosporos.

Uma ampla gama de patógenos é capaz de infectar o trato gastrointestinal, sendo que as infecções variam em efeitos, desde crises brandas autolimitadas a diarreias graves e fatais.

Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento a doença diarreica é a principal causa de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças de pouca idade, ocorrendo, também com gravidade, em indivíduos idosos e imunocomprometidos (Hofer & Hofer<sup>6</sup>).

Salienta-se ainda a inter-relação dos fatores sócio-econômicos e ambientais como condicionantes da infecção intestinal, exemplificando-se, a desnutrição como causa de prejuízos na imunidade e predispondo as pessoas à infecção bacteriana.

Sem dúvida que os vários agentes enterobacterianos podem ter tido a mesma atuação e importância sobre a saúde dos hospedeiros no passado. Entretanto, para dificultar o estabelecimento de um elo de binômio presente-passado, podemos não mais



detectar tais espécies nas fezes contemporâneas. Seja por simplesmente não estarem mais associadas a esse local na atualidade ou mesmo por degradação e dificuldades técnicas (Nogueira *et al*<sup>7</sup>).

Já as bactérias esporuladas possuem maior chance de serem detectadas, considerando as características do endósporo (Nicholson<sup>8</sup>).

Alguns estudos, apesar de incipientes e pouco divulgados, foram realizados na tentativa da detecção de organismos bacterianos em coprólitos e procuraram correlacionar os achados com o ambiente, alimentação e situação em que viviam no hospedeiro (Willerslev & Cooper<sup>9</sup>). Por outro lado, a lacuna de conhecimentos sobre o problema na América Latina e Brasil ainda é muito maior (Nogueira *et al*<sup>7</sup>).

## **2 . OBJETIVOS:**

Considerando os pontos descritos previamente e associando-os a discreta bibliografia procurou-se esquematizar a pesquisa nos seguintes aspectos:

### **2.1. OBJETIVOS GERAIS:**

- Testar e padronizar técnicas sorológicas, de biologia molecular e de isolamento para detecção e identificação de microorganismos bacterianos em amostras de coprólitos.
- Criar uma base de dados e gerenciá-la através de planilha permitindo a princípio um acesso via Web com senha para os pesquisadores do grupo de pesquisa que desejem dados gerais ou específicos sobre as amostras disponíveis no laboratório.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Avaliar diferentes técnicas laboratoriais de detecção e sua eficiência para verificar a possível presença de bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Bacillus* em coprólitos provenientes de populações sul-americanas.
- Caracterizar microorganismos possivelmente detectados, através de técnicas convencionais e moleculares.
- Analisar a frequência de representantes destes gêneros no material, tentando correlacioná-los com os sítios arqueológicos de onde foram retirados, hábitos alimentares das populações e possíveis rotas de dispersão dos agentes, a partir dos dados geográficos e das datações das amostras analisadas.
- Montar um banco de dados referente à coleção de coprólitos do laboratório de Paleoparasitologia do DCB-ENSP/FIOCRUZ, na tentativa de organizar os espécimens e catalogá-los digitalmente com referência ao país, estado, localidade, sítio arqueológico, datação, e outras informações pertinentes, facilitando a pesquisa em toda a instituição ou mesmo fora dela.

### 3- REVISÃO

#### EVOLUÇÃO HISTÓRICA DA PALEOPARASITOLOGIA

O parasitismo é inerente à vida. Os parasitos são encontrados em cada ser vivo de todas as espécies existentes na Terra (Poulin & Morand<sup>10</sup>). Desde o início da vida, o parasitismo foi utilizado por proto-organismos na sua multiplicação. Provavelmente o parasitismo deve ter ocorrido em um estágio primitivo da evolução (Bremermann<sup>11</sup>), pois a uniformidade bioquímica dos seres vivos atuais aponta para uma origem comum em um antepassado que vivia há bilhões de anos (Nasmith<sup>12</sup>, Orgel<sup>13</sup>). A vida na Terra somente foi possível em razão do parasitismo, mesmo no nível molecular, sendo que as formas de vida atuais demonstram ainda restos dessas associações antigas em seus genomas (Galtier *et al*<sup>14</sup>, Cavalier-Smith<sup>15</sup>).

Se por um lado há o confronto entre teorias relacionadas com a emergência e a evolução dos agentes parasitários, por outro, evidências arqueológicas não documentais também ilustram a complexa e antiga relação entre os parasitos, hospedeiros humanos e animais na determinação do processo saúde-doença das populações (Araújo *et al*<sup>16</sup>). Através da interação entre a Medicina, a Arqueologia e a Antropologia, foi possível a concepção de uma nova disciplina, a Paleopatologia, campo de investigação das enfermidades que nos acompanham desde a Antiguidade, por meio dos estudos de achados arqueológicos provenientes de humanos e animais.

Esta especialidade contribui também para a reconstituição do modo de vida das populações antigas, assim como de sua formação e dispersão geográfica.

Além do estudo direto de esqueletos e anomalias ósseas, as técnicas mais usadas nessas análises foram as necrópsias, que quase sempre alteram ou destroem os corpos preservados, e a radiologia, método de análise não invasivo (David<sup>17</sup>).

Metodologias empregadas no início dos estudos paleopatológicos levaram a resultados de caráter principalmente descritivos, enquanto estudos mais recentes têm procurado inserir uma análise mais qualitativa, buscando contextualizar as informações arqueológicas com modelos culturais pré-históricos sobre doenças e sua relação com o modo de vida (Aufderheide & Rodriguez-Martin<sup>18</sup>, Mendonça de Souza *et al*<sup>19</sup>).

A Paleoparasitologia é um ramo da Paleopatologia que se baseia em estudos de resquícios biológicos a procura de parasitos, visando à identificação de morbidades nas populações humanas antigas e à reconstrução de suas rotas de migração e ocupação territorial através dos tempos. Sua origem deve-se a Sir Marc Armand Ruffer que, em 1910, identificou ovos de *Schistosoma haematobium* em tecido renal de uma múmia egípcia de 3.200 anos. Ele desenvolveu técnicas de reidratação de tecidos mumificados, possibilitando preparações histológicas e, conseqüentemente, o diagnóstico de doenças em populações do antigo Egito. O intercâmbio com egiptólogos ampliou as perspectivas de estudo da ocorrência dos parasitos no passado (Ruffer<sup>20</sup>).

A associação entre os parasitologistas e os arqueólogos estruturou-se, mais tarde, a partir da análise de coprólitos coletados em sítios arqueológicos e enviados ao laboratório. Todavia, até a metade do século XX, por limitações técnicas, foram descritos em coprólitos poucos ovos e larvas de helmintos, parasitos de animais e de humanos. Destes últimos, a maioria era proveniente do interior de corpos mumificados e do conteúdo de fossas européias medievais (Szidat<sup>21</sup>, Pizzi & Schenone<sup>22</sup>, Taylor<sup>23</sup>).

O método usado para a análise dos coprólitos consistia na análise do material seco, sendo as amostras quebradas e passadas por peneiras graduadas para posterior exame microscópico (Fry<sup>24</sup>). A partir de 1960, o uso de fosfato trissódico em solução aquosa como reidratante impulsionou a Paleoparasitologia. Essa foi uma adaptação da técnica usada para recuperar espécimes dessecados em coleções de museus. Esse método, utilizado nos coprólitos dessecados, permitiu o emprego de técnicas parasitológicas comumente aplicadas nos laboratórios clínicos (Callen & Cameron<sup>25</sup>, Reinhard *et al*<sup>26</sup>). Essa melhoria da técnica possibilitou que achados de ovos e larvas de parasitos fossem mais freqüentes, demonstrando as potencialidades desta ciência e todas as suas implicações no estudo da evolução parasito-hospedeiro e da dispersão das espécies. A Paleoparasitologia mostrou, então, sua vocação para a interdisciplinaridade (Gonçalves *et al*<sup>27</sup>).

Wilke e Hall<sup>28</sup> em uma revisão comentada sobre coprólitos, fazem uma discussão sobre os problemas relativos às técnicas e às dificuldades encontradas nos estudos desse material. Apesar de mais de trinta anos passados, algumas perguntas ainda não estão totalmente solucionadas, como a confiabilidade da origem humana das amostras e as interpretações sobre o parasitismo e o falso-parasitismo.

Desde então, diversas espécies de parasitos têm sido evidenciadas, dentre as quais os helmintos são os mais freqüentes, tanto em tecidos mumificados quanto em fezes dessecadas. No entanto, a identificação de outros organismos, como protozoários, ainda é escassa em razão da fácil destruição de sua membrana cística por processos ambientais adversos (Bouchet *et al*<sup>29</sup>). Métodos de identificação dos antígenos têm sido empregados na tentativa de se obter um diagnóstico mais acurado desses parasitos (Gonçalves *et al*<sup>30</sup>).

Os materiais mais comumente pesquisados na Paleoparasitologia são os coprólitos, ou seja, fezes humanas ou de animais preservadas por dessecação, mineralização, ou condições de anaerobiose em ambientes úmidos ou secos. São recolhidos de camadas arqueológicas, latrinas ou diretamente do lúmen intestinal de corpos mumificados (Bouchet *et al*<sup>29</sup>). Outras fontes importantes de material são os sedimentos de latrinas, compostos de grande quantidade de coprólitos já desintegrados, e corpos mumificados, seja por preparo artificial oriundo de prática cultural e religiosa ou por condições ambientais naturais.

A contribuição da Paleoparasitologia tem sido significativa no estudo das populações ameríndias do período pré-colombiano, possibilitando o reconhecimento e a análise evolutiva das infecções parasitárias que ocorriam na América antes do século XV (Mendonça de Souza *et al*<sup>31</sup>). Assim, o fato de serem encontrados ovos de ancilostomídeos em coprólitos com datação de alguns milhares de anos refuta a idéia de ocupação exclusiva da América através do estreito de Bering, pela impossibilidade de manutenção do ciclo do parasito em tão baixa temperatura do solo. Evidências de outros agravos, como treponematoses, tuberculose e Doença de Chagas, já foram documentadas com base em material anterior à ocupação européia no século XV (Fornaciari *et al*<sup>32</sup>, Gonçalves *et al*<sup>27</sup>, Sianto *et al*<sup>33</sup>).

O mesmo tipo de trabalho vem sendo realizado no Velho Mundo (Nozais<sup>34</sup>), buscando-se a origem e a dispersão das infecções parasitárias. A técnica clássica de pesquisa inicia-se pela datação, que é realizada no material por métodos físicos (geralmente radiocarbono ou termoluminescência) e feita nas camadas arqueológicas ou diretamente no coprólito, ou ainda por contexto cultural (Gonçalves *et al*<sup>27</sup>). No exame morfológico geral do coprólito e no teor de seus restos alimentares, são obtidos dados que auxiliam na identificação de sua origem zoológica (Chame<sup>35</sup>) e estabelecidos parâmetros que podem revelar importantes associações dos achados com padrões da

dieta, paleoclima, paleobotânica e adaptações paleoecológicas. Esses dados têm proporcionado a criação da linha de investigação da Paleoepidemiologia (Wilke & Hall<sup>36</sup>, Andrews & Fernandez-Jalvo<sup>37</sup>, Chaves & Reinhard<sup>38</sup>).

A técnica microscópica consiste na visualização em microscopia óptica de sedimentos provenientes do coprólito. Caso este esteja preservado por dessecação, a reidratação é feita com solução aquosa de fosfato trissódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) a 0,5% por 72 horas (Callen & Cameron<sup>25</sup>). No caso de coprólito mineralizado, utiliza-se ácido clorídrico a 10% até sua desagregação, conforme a técnica de Jones<sup>39</sup>. Concluída essa etapa, o material é concentrado pela técnica de sedimentação espontânea (Reinhard *et al.*<sup>40</sup>). O sedimento é então examinado no microscópio e devidamente identificado. As larvas e ovos encontrados são medidos e fotografados para comparações morfométricas. Esses dados são extremamente úteis como tentativa de identificar as espécies envolvidas e confirmar ou não a origem humana do coprólito (Confalonieri *et al.*<sup>41</sup>, Chame *et al.*<sup>42</sup>).

Vários trabalhos usando esta técnica já foram realizados com sucesso, entre eles a pesquisa de diferentes ácaros (Guerra *et al.*<sup>43</sup>), ovos e vestígios de distintos parasitos (Ferreira *et al.*<sup>44</sup>) e larvas de helmintos (Ferreira *et al.*<sup>45</sup>). No Japão, estudos realizados em antigos banheiros evidenciaram, entre outros achados, ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Taenia* spp. (Matsui *et al.*<sup>46</sup>).

As múmias possuem um papel extremamente importante como fonte de informação, pois, a partir desse material, é possível afirmar, com certeza, que os restos de fezes recuperados são de seres humanos, o que pode não ocorrer com toda precisão nos coprólitos de sítios arqueológicos ou latrinas (Reinhard<sup>26</sup>). Nessa situação, mesmo identificando o material como possivelmente humano, é impossível determinar o número de indivíduos acometidos ou se a parasitose estava presente em todos (Reinhard<sup>47</sup>, Araújo *et al.*<sup>48</sup>). Assim, a maioria dos estudos epidemiológicos da Paleoparasitologia humana está associada, atualmente, à análise do conteúdo gastrointestinal de múmias.

Todavia, muitos esforços estão sendo feitos no sentido de identificar com maior sensibilidade a origem dos coprólitos analisados (humanos ou animais), buscando-se detectar alguma substância e/ou substrato genuínos de determinada espécie (Nogueira *et al.*<sup>7</sup>).

Outro procedimento utilizado nessa investigação tem sido a técnica imunológica. Enquanto há dificuldade de detecção direta de protozoários pelo método clássico em coprólitos (Reinhard *et al*<sup>40</sup>, Gonçalves *et al*<sup>49</sup>), os antígenos permanecem detectáveis por longos períodos em material antigo. Com a utilização dessas técnicas foram recuperadas proteínas ancestrais (Lowenstein<sup>50,51,52,53,54</sup>), resgatando a informação genética a partir da seqüência de aminoácidos. Outros achados bem sucedidos detectaram a presença de *Giardia duodenalis* por meio de técnicas imunológicas em material com mais de 2 mil anos (Faulkner *et al*<sup>55</sup>, Allison *et al*<sup>56</sup>, Gonçalves *et al*<sup>57</sup>).

O teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Voller *et al*<sup>58</sup>), com anticorpos monoclonais, tem sido empregado de forma promissora na atualidade (Guhl *et al*<sup>59</sup>). No Brasil, Gonçalves utilizou esta técnica e concluiu que sua sensibilidade era maior do que o exame microscópico para detecção de *Giardia duodenalis*. Usando um *kit* comercial, identificou a presença do protozoário em amostras ancestrais (Gonçalves *et al*<sup>30</sup>).

Outra linha desenvolvida foi associada as pesquisas que utilizaram técnicas de biologia molecular para a detecção de fragmentos de ácido desoxirribonucléico de material biológico preservado ou fossilizado (Brown *et al*<sup>60</sup>).

O termo *ancient DNA* (aDNA) engloba qualquer massa ou traço de DNA originado de um organismo morto ou de parte deste. Entretanto, qualquer DNA que tenha sido submetido a processos de autólise ou qualquer tipo de fixação é considerado aDNA (Herrmann & Hummel<sup>61</sup>). Esse material também chamado de DNA antigo tem auxiliado de forma bastante abrangente esses estudos.

Podemos então considerar que o DNA recuperável em organismos ou seus restos, preparados por técnicas especiais de conservação nos museus, ou mesmo preservados naturalmente, é aDNA, passível de recuperação, análise e identificação pelas técnicas empregadas para os demais estudos antropológicos (Costa<sup>62</sup>). Tais estudos tiveram grande repercussão em todas as subdisciplinas da Biologia moderna, incluindo a evolução, a conservação biológica, a biologia animal e vegetal, a antropologia e a saúde humana, particularmente no que se refere às doenças infecciosas (Herrmann & Hummel<sup>61</sup>).

Segundo Lindahl<sup>63</sup>, apesar do seu potencial, os ácidos nucléicos possuiriam baixa possibilidade de preservação em fósseis, em razão, principalmente, da existência

de água na amostra, o que rapidamente hidrolisa o DNA. Todavia, tentativas para extrair o DNA de espécimes preservados e fósseis começaram a partir da segunda metade dos anos 1980, tornando-se mais comuns com o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Waggoner<sup>64</sup>).

Na técnica da PCR (Powledge<sup>65</sup>) a existência de somente uma fita intacta de DNA-alvo é suficiente para produzir milhares de cópias deste fragmento, facilmente detectáveis por eletroforese (Mullis & Fallona<sup>66</sup>). Segundo Pääbo, esta técnica é ideal para o estudo do aDNA. O próprio autor, junto com seus colaboradores, publicou vários trabalhos de padronização da técnica da PCR para diferentes amostras, inclusive sugerindo estratégias para recuperação de aDNA degradado ou em mínimas quantidades<sup>67, 68, 69, 70, 71</sup>.

De acordo com as pesquisas de Willerslev e colaboradores<sup>72</sup>, que usaram técnicas apuradas para detecção, manutenção e recuperação de aDNA bacteriano, foi possível reconhecê-lo em espécimes na ordem de 400 mil anos ou mais. A pesquisa utilizou amostras preservadas em temperaturas constantes abaixo de zero, pH neutro e condições de anaerobiose, situações incomuns para esse tipo de análise.

É importante ressaltar que esta prática deve seguir rigoroso controle da qualidade para evitar problemas de contaminação com DNA contemporâneo, e sua técnica inclui diversas recomendações a serem seguidas, incluindo controles negativos e duplicação do teste em diferentes laboratórios (Pääbo<sup>70</sup>, Lindahl<sup>73</sup>, Cooper & Poinar<sup>74</sup>, Vreeland & Rosenzweig<sup>75</sup>).

## NOVAS PERSPECTIVAS

Com o incremento de estudos na Paleoparasitologia através da biologia molecular e da análise de interações sorológicas com anticorpos monoclonais, abriu-se uma nova possibilidade para a pesquisa de organismos não detectáveis pela análise direta de vestígios, tendo como pioneiros nestes estudos os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. e *Plasmodium falciparum* (Miller *et al*<sup>76</sup>, Taylor *et al*<sup>77</sup>, Guhl *et al*<sup>78</sup>, Guhl *et al*<sup>79</sup>, Aufderheide *et al*<sup>80</sup>).

Essas novas técnicas reforçaram a idéia da Paleoparasitologia como ciência interdisciplinar, permitindo também a pesquisa de organismos não evidenciáveis



anteriormente como, por exemplo, as bactérias (Araújo *et al*<sup>3</sup>, Pääbo<sup>4</sup>, Palhano & Nogueira<sup>81</sup>).

Segundo Drancourt e Raoult<sup>82</sup>, o estudo de bactérias em material arqueológico teve início em 1993 com a detecção molecular de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em esqueletos humanos (Spigelman *et al*<sup>83</sup>). Usando os mesmos *primers*, Salo e colaboradores<sup>84</sup> identificaram a bactéria no pulmão de uma múmia de mil anos. Seguindo a mesma linha, Rafi e colaboradores<sup>85</sup> demonstraram a presença de *Mycobacterium leprae* em ossos. Prat e Mendonça de Souza<sup>86</sup> publicaram uma retrospectiva comentada sobre os achados de tuberculose nas populações das Américas pré-históricas e, no ano seguinte, Donoghue e colaboradores<sup>87</sup> retomaram o tema e fizeram uma ampla revisão sobre *Mycobacterium* e aDNA.

A maioria dos estudos iniciais era baseada em análise de tecido ósseo (Larsen<sup>88</sup>), contudo a evolução dessas pesquisas permitiu, na atualidade, a utilização de outros materiais como tecidos mumificados e polpa dentária.

Os objetivos da Paleoparasitologia (Araújo *et al*<sup>16</sup>, Drancourt & Raoult<sup>82</sup>) incluem o diagnóstico de doenças do passado, a detecção de microorganismos patogênicos (vírus, bactérias, protozoários, helmintos ou outros organismos) em material biológico ancestral, a elucidação da epidemiologia dos agravos ocorridos no passado pela reconstituição temporal e geográfica dos indivíduos infectados, reservatórios e vetores. Esses estudos apontam também para a possibilidade de traçar a evolução genética dos microorganismos encontrados. Tais dados certamente são de grande valia para o estudo das interações parasito-hospedeiro, em particular no que concerne às doenças infecciosas (Drancourt & Raoult<sup>82</sup>).

A análise do aDNA surge como uma das mais promissoras técnicas dentro da Paleopatologia. Numerosos estudos mostraram a possibilidade de recuperação de ácidos nucleicos de material arqueológico (Willcox<sup>89</sup>). A técnica da PCR tem sido utilizada com esse intuito desde 1997, com a detecção de *Escherichia coli* do conteúdo intestinal de múmias datadas do século III (Fricker *et al*<sup>90</sup>). Esta pesquisa demonstrou tal possibilidade, mas ressaltou as inúmeras dificuldades relacionadas com o uso de fezes ancestrais como material de investigação.

Salienta-se que na pesquisa de agentes bacterianos, em material arqueológico já manipulado, como coprólitos, por técnicas de biologia molecular, as amostras deverão

inicialmente ser tratadas com irradiação ultravioleta a fim de evitar contaminação com DNA contemporâneo (Santos<sup>91</sup>, Iñiguez *et al*<sup>92</sup>).

A Reação da Polimerização em Cadeia (PCR) é usada para amplificar um segmento de DNA entre duas regiões de seqüência conhecida. Assim, dois oligonucleotídeos (com seqüências diferentes e complementares) são usados como *primers* numa série de reações catalisadas pela enzima DNA polimerase. O *primer* a ser utilizado é definido com base em seqüência já conhecida, específica para o agente a ser pesquisado. A eletroforese em gel de agarose é um método padrão usado para separar, identificar e purificar os fragmentos de DNA amplificados (Sambrook *et al*<sup>93</sup>).

Iñiguez<sup>5</sup> demonstrou a possibilidade real de recuperação de DNA bacteriano de fezes dessecadas artificialmente, através da técnica de PCR, e conseguiu recuperar, após inoculação de *Vibrio cholerae* e *Bacillus sphaericus*, material genético desses microorganismos. A mesma pesquisadora, utilizando a técnica de RAPD-PCR, obteve as seqüências intactas de DNA de *Shigella flexneri* de coprólitos ancestrais.

Ubaldi e colaboradores<sup>94</sup> foram capazes de detectar com sucesso aDNA humano e bacteriano de tecidos provenientes de órgãos internos de uma múmia andina do século X. Nesse estudo foi particularmente importante a caracterização da flora intestinal, que não sofreu os mesmos estímulos externos atuais, como dieta, interações ambientais, drogas e substâncias carcinogênicas, possibilitando comparações com a microbiota bacteriana atual.

Ainda em 1998, experimentos<sup>95</sup>, utilizando extração de aDNA de polpa dentária foram capazes de evidenciar DNA de *Yersinia pestis*, agente etiológico da peste murina ou negra, causadora de importante zoonose epidêmica que matou milhões de pessoas na Europa, confirmando sua existência em esqueletos dos séculos XVI e XVIII.

Rollo e Marota<sup>96</sup>, do departamento de Biologia Molecular, da Universidade de Camerino – Itália, fizeram um trabalho retrospectivo, analisando outros achados, inclusive do mesmo grupo. Concluíram que, apesar das inúmeras respostas que estas análises podem fornecer, o estudo do aDNA representa uma tarefa de extrema exigência técnica, principalmente pela dificuldade de diferenciá-lo do DNA atual. Finalmente, sugerem que protocolos rigorosos devem ser aplicados para garantir a autenticidade dos resultados encontrados.

Em outro estudo, uma equipe alemã demonstrou a presença de DNA bacteriano no metatarso de uma múmia de criança egípcia, evidenciando uma possível bacteremia. Esses dados, associados a sinais ósseos de anemia crônica e deficiência de vitamina C, sugeriram aos autores tratar-se de infecção gastrointestinal com uma bactéria invasiva que se tornou sistêmica (Zink *et al*<sup>97</sup>).

Cano e colaboradores<sup>98</sup>, extraindo DNA de amostras do estômago e cólon de uma múmia congelada do período neolítico (aproximadamente 5.350-5.100 anos atrás) e usando a técnica da PCR, foram capazes de identificar, após clonagem, bactérias comuns da flora fecal humana, bem como membros bacterianos do gênero *Vibrio*, comum em habitantes aquáticos.

Segundo Waggoner<sup>64</sup>, atualmente o DNA pode ser extraído de diferentes espécimes de animais e vegetais mantidos em museus. Conseqüentemente, também é possível detectá-lo em organismos como helmintos, protozoários e bactérias presentes nos restos preservados.

Estudos feitos no Brasil por Iñiguez e colaboradores<sup>92,99</sup> mostraram a importância da utilização de novas técnicas como polimerização reconstitutiva (RP) e o RAPD-PCR (amplificação polimórfica randômica), as quais têm aumentado as possibilidades de sucesso com o aDNA que, em grande parte das amostras, se apresenta danificado. Conjugando essas técnicas em coprólitos provenientes do Chile e América do Norte, foram capazes de detectar aDNA de *Enterobius vermicularis*. Apesar de nem todas amostras se apresentarem positivas, os pesquisadores indicaram a possibilidade de, com o auxílio da técnica, comparar as seqüências antigas com as contemporâneas, estimulando estudos sobre a evolução da interação parasito-hospedeiro.

Apesar dos achados significativos de diferentes grupos de pesquisa, outros trabalhos demonstraram as falhas, criticando e sugerindo diferentes metodologias para essas análises, principalmente em relação ao controle de contaminação contemporânea (Nickle *et al*<sup>100</sup>, Yoder & Delefosse<sup>101</sup>).

Vários autores referiram-se a dificuldades no isolamento de aDNA em coprólitos, em virtude da interferência de múltiplos fatores associados a essas amostras. Entretanto, existem algumas técnicas capazes de melhorar a extração ou facilitar a análise, razão pela qual os estudos em paralelo deverão ser realizados (Poinar *et al*<sup>102</sup>). Assim, nesta linha de raciocínio, Vray<sup>103</sup> destaca as novas tecnologias como

imprescindíveis para futuros estudos de filogenia e sistemática de parasitos, bem como para o melhor entendimento da história das doenças parasitárias.

Estudos contemporâneos têm procurado detectar aDNA, inclusive de vírus, em restos humanos e de animais (Fornaciari & Marchetti<sup>104</sup>, Cano *et al*<sup>105</sup>, Dube *et al*<sup>106</sup>, Reid *et al*<sup>107</sup>, Basler *et al*<sup>108</sup>, Fornaciari *et al*<sup>109</sup>). Segundo Collins<sup>110</sup>, algumas proteínas são capazes de se conservar por mais tempo, sendo reconhecidas de forma mais efetiva do que os ácidos nucléicos em tecido ósseo e, por conseguinte, oferecem maiores possibilidades de identificação e aplicação nas análises paleoparasitológicas.

Cerutti e colaboradores<sup>111</sup>, atualizando os trabalhos de Drancourt e sua equipe<sup>95</sup>, discutiram essas técnicas e apresentaram novos achados de *Y.pestis*, bactéria causadora da peste negra que assolou a população européia entre 1347 e 1352. Esse trabalho foi realizado com material ósseo e dentário obtido em diferentes sítios europeus, historicamente documentados como sepulturas de vítimas da peste. Os achados, inicialmente obtidos por análise imunoquímica, foram confirmados pela análise do aDNA.

## POSSIBILIDADES DE CULTIVO

Estudos com material congelado têm conseguido recuperar microorganismos de substratos muito antigos com base em técnicas clássicas de cultivo em meios de cultura, Christner e sua equipe<sup>112</sup>, por exemplo, obtiveram organismos bacterianos viáveis de gelo glacial com idade superior a 750.000 anos. Um trabalho anterior semelhante havia sido realizado por Shi e colaboradores<sup>113</sup> no qual foram isoladas bactérias do solo da Sibéria (permafrost) em profundidades datadas de até três milhões de anos. Aproximadamente 30% destes isolados se mostraram capazes de formar endósporos.

Uma outra possibilidade estaria então associada ao estudo de microorganismos esporulantes, que nestes casos não precisam necessariamente estar preservados pelo frio. Os endósporos bacterianos, mas conhecidos como esporos, são estruturas extremamente resistentes que ocorrem somente em alguns gêneros quando as condições ambientais se tornam inadequadas para manter a forma vegetativa destes organismos (Halvorson<sup>114</sup>, Foster<sup>115</sup>, Driks<sup>116</sup>).

Quando o microorganismo está no chamado “estado latente”, não se detecta nos esporos nenhum tipo de metabolismo, e estas estruturas apresentam um maior grau

de resistência à inativação por vários agravos físicos, incluindo calor seco e úmido, radiações ultravioleta e gama, extrema dessecação (incluindo vácuo), e agentes oxidantes. Apesar da sua metabólica inatividade, os esporos são ainda capazes de acompanhar continuamente o ambiente e os nutrientes disponíveis, podendo responder rapidamente à sua presença através da germinação e crescimento vegetativo bacteriano (Setlow<sup>117</sup>, Nicholson *et al*<sup>118</sup>, Nicholson<sup>119</sup>).

Entre os organismos bacterianos de importância clínica, capazes de produzir estas estruturas, encontramos o gênero *Bacillus* e *Clostridium*, todavia vários outros gêneros de bactérias como, por exemplo, *Amphibacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Sporohalobacter*, *Oscillospira* e *Thermoactinomyces* também possuem esta capacidade (Bergey & Holt<sup>120</sup>).

A resistência dos esporos tem sido objeto de estudo há vários anos, e pesquisas sobre sua morfologia e bioquímica (Young & Fitz-James<sup>121,122,123</sup>) têm sido feitas desde o século passado. Corroborando este conhecimento já sedimentado, ainda hoje são descobertas estruturas desta natureza que se mantêm íntegras podendo permitir posterior germinação, mesmo após processos de destruição modernos como UHT (ultra-high temperature), como alguns endosporos gerados por espécies do gênero *Bacillus* (Scheldeman *et al*<sup>124</sup>).

Apesar de uma estrutura bastante estudada, só recentemente chamou-se atenção para o seu potencial como fonte de informação para estudos de organismos em material antigo (Nilsson & Renberg<sup>125</sup>). Segundo os relatos de Cano & Borucki<sup>126</sup> sua equipe foi capaz de reviver esporos presentes em uma abelha preservada em âmbar por cerca de 25 a 40 milhões de anos, enquanto Nicholson<sup>119</sup> estudou a probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo, de endosporos termofílicos de várias espécies do gênero *Bacillus* isolando-os de formações com milhares de anos. Joshua Gatson e sua equipe<sup>127</sup> conseguiram isolar esporos viáveis e cultivar amostras de *Bacillus* de uma tumba mexicana datada de 2000 anos.

Alguns autores sugerem que estes microorganismos, por suas possíveis características diferenciadas, deveriam ser mais bem classificados com base no seu genótipo e não somente em características fenotípicas (Gatson *et al*<sup>127</sup>).

ESTADO DE ARTE

Segundo a revisão feita por Bouchet e seus colaboradores<sup>128</sup>, a Paleoparasitologia está caminhando para o seu estado de arte, contribuindo para a história das relações parasito-hospedeiro, assim como abrindo novos campos no estudo das dimensões espaço-temporais do parasitismo que favorecem os conhecimentos sobre a emergência e reemergência das doenças infecciosas. Combes<sup>129</sup> (2003) é da mesma opinião e aponta a Paleoparasitologia como o caminho para o diálogo entre diferentes disciplinas como a Paleontologia, a Arqueologia, a História, a Medicina humana e veterinária, a Epidemiologia, a Geografia e a Biologia Molecular, entre outras.

Nogueira e colaboradores acrescentam, ainda, comentários sobre a importância dos aspectos bioéticos na pesquisa paleoparasitológica, dentro do que pode ser considerado o estado de arte deste segmento<sup>130,131</sup>.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1- Material utilizado

Nosso trabalho utilizou como material de análise, coprólitos humanos e de animais, totalizando 14 amostras (Tabela 01) originárias de três sítios arqueológicos sul-americanos, pertencentes à coleção do Laboratório de Paleoparasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP/FIOCRUZ. Entre os vários sítios possíveis, escolhemos dois coprólitos provenientes de uma múmia encontrada em São Pedro de Atacama no Chile (Figura 01) e incluímos também cinco espécimes pertencentes à Serra da Capivara – Piauí (Figura 02), um do Boqueirão da Pedra Furada e outros quatro do Sítio do Meio. Escolhemos outros sete coprólitos da Gruta do Gentio II, sítio arqueológico existente em Unai - Minas Gerais (Figura 03).

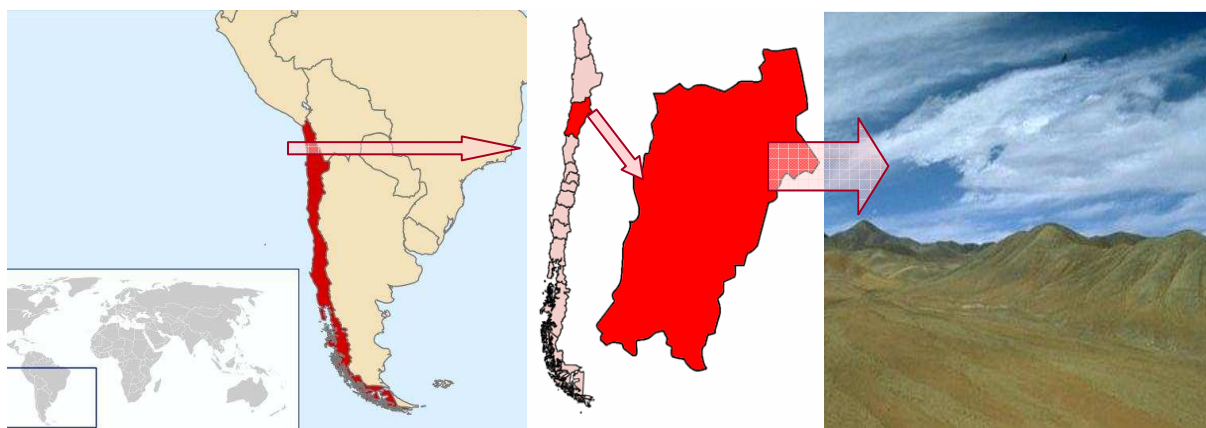


Figura 01 – Mapas de localização e ilustração referentes ao Deserto de Atacama – Chile

O deserto do Atacama está localizado na região norte do Chile, com cerca de 200 km de extensão e é considerado o deserto mais alto e mais árido do mundo, devido ao baixo índice pluviométrico. As temperaturas no deserto variam entre 0°C a noite a 40°C durante o dia, razão pela qual a influência antrópica é desprezível, considerando as poucas aglomerações humanas existentes. Salienta-se que a área mais populosa é São Pedro do Atacama, com pouco mais de 3.000 habitantes e localizada a 2.400 metros de altitude.



Figura 02 – Ilustração e Mapas de localização referentes a Serra da Capivara – São Raimundo Nonato - Piauí – Brasil

O Parque Nacional da Serra da Capivara está localizado no sudeste do estado do Piauí. Em uma área semi-árida, fronteira entre duas grandes formações geológicas: a bacia sedimentar Maranhão-Piauí e a depressão periférica do rio São Francisco. Com paisagens variadas e vegetação de caatinga, ocupa as áreas dos municípios de São Raimundo Nonato, São João do Piauí, Coronel José Dias e Canto do Buriti. Tem perímetro de 214 quilômetros e foi criado em 05 de junho de 1979, para proteger um dos mais importantes parques arqueológicos do Brasil.



Figura 03 - Mapas de localização do Município Unaí - Minas Gerais – Brasil e ilustração referente ao sítio Gruta do Gentio II nesta mesma localidade.

Unaí é um município brasileiro do noroeste do estado de Minas Gerais. O clima é tropical, com temperaturas oscilando entre 10°C a 35°C, com média anual de



24°C. A precipitação pluviométrica média anual é de 1.200mm. A Gruta do Gentio II, em Unai, apresenta datações bastante significativas, tendo entre seus achados antigos materiais com cerca de 8.620 +/-100 anos, período correspondente à ocupação por caçadores-coletores, mas foi nas camadas mais recentes, de 3.490 +/-120 a 430 +/-70 anos, correspondentes à ocupação por agricultores ceramistas, que foram encontrados numerosos coprólitos.

No presente estudo foram selecionados os coprólitos deste período, cujos detalhes constam na tabela 01, a maioria sem especificações definidas da origem. Excetuando-se a amostra 930a corresponde a fezes de roedor, provavelmente *Kerodon rupestris* muito comum na região e a amostra 1216 a partir da qual houveram achados microscópicos anteriores sugestivos de *Enterobios vermiculares*, indicando se tratar possivelmente de espécim humano.

Tabela 01-Relação das amostras selecionadas através do banco de dados e seus detalhes.

Número da amostra	situação da amostra	Sítio	município/estado/país	datação	setor ***	nível cm
30 a	cop+sed *	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	ND3	30/40 ****
31 a	cop+sed	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	OA1	30/65
31 b	cop+sed	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	OA1	30/65
32 a	cop+sed	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	ND3	15/20
33 a	cop+sed	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	NC3	20/45
34 a	cop+sed	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	NC3	45/60
35 a	cop+sed	Gruta do Gentio II	Unai/MG/Brasil	3.490 +/-120 a 430 +/- 70	NC3	superficial
758	cop+sed	Boqueirão da Pedra Furada	S R Nonato/PI/Brasil	20.000 BP?	EL	7(F4)
930 a	cop+sed	Sítio do Meio	S R Nonato/PI/Brasil	ND **	2 ext.	EB
956	cop+sed	Sítio do Meio	S R Nonato/PI/Brasil	ND	4/D6	3/92
1216 a	cop+sed	Sítio do Meio	S R Nonato/PI/Brasil	8.800 BP	2 ext	8 decap
1224	cop+sed	Sítio do Meio	S R Nonato/PI/Brasil	ND	3	1F3
M04	cop+sed	Catarpe 2	Atacama, San Pedro de/EI Loa/Chile	1.200 a 1.400 DC		Múmia
M05	cop+sed	Catarpe 2	Atacama, San Pedro de/EI Loa/Chile	1.200 a 1.400 DC		Múmia

\* cop+sed=coprólitos e sedimento; \*\* ND = Não determinado; \*\*\*setor = Local do sítio; \*\*\*\*nível= Localização do coprólito/profundidade

### 3.2 - Metodologia

A pesquisa paleoparasitológica está intimamente associada à arqueologia, explorando os sítios arqueológicos, organizando os dados e informações sobre os espécimens encontrados e enviando-os acondicionados de forma correta a um centro de pesquisas para análise (Bouchet *et al*<sup>29</sup>, Duarte *et al*<sup>1</sup>). No caso presente, ao Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública.

O coprólito (Figura 04), quando encontrado em um sítio arqueológico, é fotografado, desenhado e minuciosamente observado, quanto a sua dimensão, cor,

forma, volume, número de unidades, fragmentos visíveis na superfície, local, data da coleta, coletor, número da amostra e datação da camada onde foi encontrado. Todos estes dados são registrados e o material é então devidamente embalado em plástico, etiquetado e enviado ao laboratório.

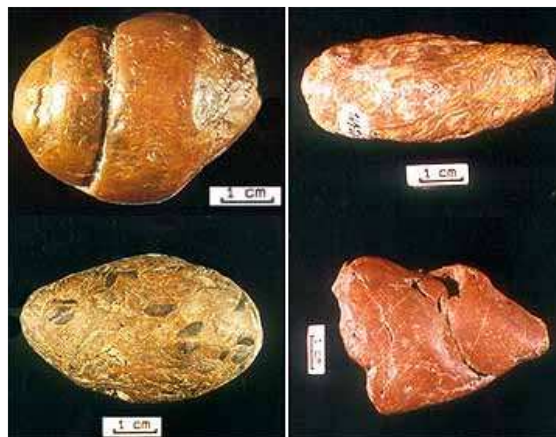


Figura 04 – Aspectos morfológicos e dimensão de coprólitos variados

O mesmo ocorre quando a retirada do coprólito é feita diretamente do interior de um corpo mumificado por processo natural ou artificial. A diferença é que o material é retirado com luvas estéreis e acondicionado assepticamente em sacos plásticos bem vedados e livres de contaminação externa.

Todas as amostras são catalogadas em livros, desenhadas e as informações associadas compiladas para livros mantidos no laboratório, onde as amostras permanecem colecionadas. Qualquer forma de acesso às informações e ao material só é permitida através de autorização da chefia.

A idéia da criação do banco de dados surgiu justamente pela dificuldade de se cotejar minuciosamente os dados referentes às novas amostras, com aquelas catalogadas anteriormente.

Todas as informações anotadas nos livros foram digitadas para um programa de banco de dados e separadas em várias opções de acesso, como país, localidade, sítio arqueológico e datação, entre outras (Nogueira *et al*<sup>132</sup>).

Esses dados estão acessíveis a qualquer pesquisador da instituição, bem como de fora, obtidos através de uma senha autorizada pela curadoria da coleção. Desta forma digital as informações gerais sobre os espécimens se tornam mais disponíveis,

contribuindo para um melhor conhecimento de sua origem e quaisquer outras correlações catalogadas.

Os coprólitos de forma ovóide, caracterizados pela maior variação do tamanho, gretas e estruturas vegetais confirmam aspectos de afinidade com excrementos de dieta herbívora. As formas cilíndricas com peso e tamanho mais uniformes são caracterizadas pelo alto grau de compactação interna, associada a dieta carnívora ou onívora (Souto<sup>133</sup>).

A determinação da origem humana dos coprólitos também se baseia em diferentes parâmetros como cor, forma e conteúdo, porém sua identificação é facilitada quando, no material se detecta formas evolutivas de parasitos específicos para o homem. Caso contrário procura-se avaliar, baseado no conhecimento da fauna da região e por comparação com coleções de referência, quais os animais que poderiam ter originado o material (Chame *et al*<sup>35</sup>).

### **3.2.1- Tratamento dos coprólitos**

Em alguns casos, após recebimento do material para análise, o coprólito, ou parte deste é separada e reidratado com solução aquosa a 0,5% de fosfato trissódico ( $\text{Na}_3\text{HPO}_4$ ) por 72 horas, em frasco de vidro transparente com tampa hermética (Duarte *et al*<sup>1</sup>).

Após a hidratação o material é agitado e dissociado delicadamente com bastão de vidro, para não danificar possíveis elementos associados. A suspensão final é filtrada em peneiras metálicas com malhas de 250 a 150 $\mu\text{m}$  de abertura, consecutivamente. Parte do material será analisada e o restante armazenado sob a forma de sedimento conservado em frascos a temperatura ambiente.

Em outros casos os coprólitos são mantidos em sacos plásticos bem vedados e guardados na coleção do laboratório, como já foi comentado.

A partir destes coprólitos (mantidos intactos) é que demos início ao nosso estudo. Sob autorização do chefe do laboratório os espécimens, separados através da análise dos dados informatizados, foram retirados da coleção, irradiados e perfurados assepticamente conforme descrito nos métodos. Esse material, proveniente de seu interior, foi então usado para nossa pesquisa.

### 3.2.2 - Técnicas para a obtenção do material do coprólito para pesquisa microbiológica.

Os coprólitos escolhidos de acordo com a quantidade de material disponível, datação e sítios arqueológicos (Tabela 01) foram localizados na coleção de acordo com a informação do banco de dados. Com auxílio de luvas foram retirados com suas embalagens das caixas de armazenamento. Após a escolha, foram encaminhados ao Setor de Microbiologia do Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da ENSP e suas embalagens, após limpas no exterior com álcool 70% foram abertas somente em câmara de segurança biológica de classe II. No interior da câmara, os coprólitos foram então limpos externamente com gaze estéril seca e, posteriormente, irradiados com cinco lâmpadas de luz ultravioleta de 254nm em compartimento fechado semelhante ao Stratalinker® UV Crosslinker – Stratagene, por 30 minutos de cada lado (Iñiguez *et al*<sup>92</sup>, Santos<sup>91</sup>).

Manipulados com luvas estéreis, os coprólitos foram perfurados assepticamente com auxílio de uma micro-retífica e brocas estéreis em duas diferentes profundidades, cerca de 2,5 a 3,0 mm na primeira perfuração e cerca de 5,0 mm na segunda. É importante frisar que houve troca de brocas entre as perfurações e somente o material proveniente da segunda perfuração, ou seja, da porção mais interna foi usado para nossa pesquisa (figura 05). Este procedimento visou utilizar no estudo somente o material melhor preservado e que menos sofreu ação externa.

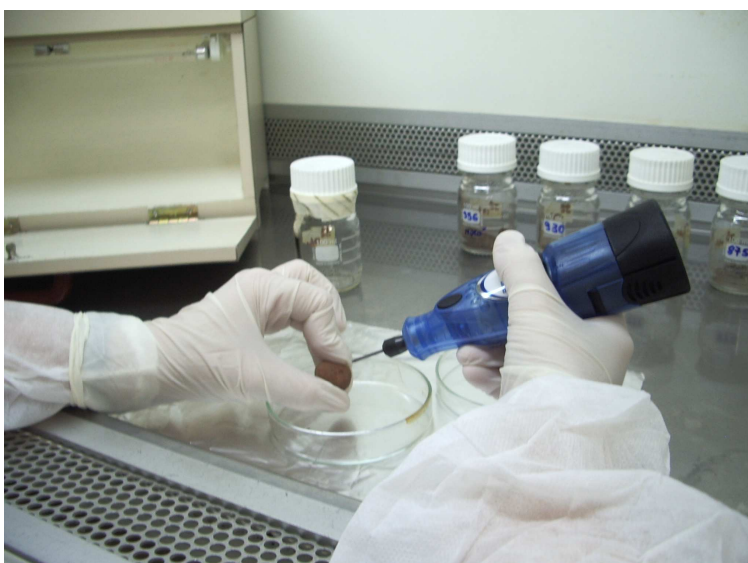


Figura 05 – Retirada do material do coprólito através de perfuração asséptica.

### 3.2.3 - Técnicas para detecção de bactérias em coprólitos

Para pesquisa de microorganismos ou traços destes, sugerimos os gêneros *Bacillus* e *Salmonella* e a espécie *Escherichia coli*.

O primeiro não só por sua participação na microbiota de alguns animais, mas pela maior possibilidade de detecção já que se trata de bactéria capaz de produzir endósporos<sup>119,126,127</sup>. Os dois últimos por sua conhecida associação ao trato intestinal. A *Salmonella*<sup>94</sup> como agente importante de zoonoses, ligado ao consumo de ovos crus, aves e água contaminada. A *E.coli*, que pode estar associada a problemas intestinais, mas também com grupos participando da microbiota autóctone humana e de animais<sup>90</sup>.

Na investigação microbiológica dos coprólitos recorreu-se às técnicas convencionais, sorológicas e moleculares. As técnicas sorológicas foram realizadas no setor de Imunodiagnóstico; as técnicas de cultivo, realizadas no setor de Microbiologia e as técnicas moleculares para pesquisa específica de *Escherichia coli* foram realizadas em colaboração com o setor de Epidemiologia molecular, todos os setores pertencentes ao Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) na Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP) - FIOCRUZ. Todas as demais técnicas moleculares foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ.

Os cultivos positivos foram confirmados no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do IOC - FIOCRUZ.

Paralelamente, foram analisados coprólitos experimentais, confeccionados a partir de argila, com o objetivo de verificar a viabilidade dos esporos bacterianos e a eficiência dos métodos de irradiação.

#### 3.2.3.1 - Técnicas Sorológicas

As técnicas sorológicas foram aplicadas visando a pesquisa do antígeno gênero-específico de *Salmonella*, nas amostras de coprólitos pertencentes ao estudo, recorrendo-se ao ensaio imunoenzimático (ELISA).

- **Ensaio Imunoenzimático (ELISA):**

Para a realização do ELISA, as imunoglobulinas polivalentes específicas anti-*Salmonella* sp. imobilizadas em placas plásticas de microdiluição (Voller *et al*<sup>58</sup>) são usadas com o propósito de capturar os antígenos correspondentes nas amostras de coprólitos. A revelação da reação primária é efetuada com o emprego do conjugado anti-*Salmonella* sp. - peroxidase, seguida da adição do substrato cromogênico (Campbell<sup>134</sup>, Harlow & Lane<sup>135</sup>, Nakane & Kawaoi<sup>136</sup>). Para a realização do experimento foi empregado o ensaio imunoenzimático *Assurance Gold EIA Salmonella* (Biocontrol<sup>137</sup>). Este método é certificado pela Association of Analytical Communities como um método oficial (registro 999.08) para detecção de *Salmonella* em alimentos e amostras ambientais (AOAC International), sendo realizada a técnica segundo o protocolo definido pelo fabricante, eliminando-se as etapas de pré-enriquecimento e de enriquecimento seletivo, uma vez que, provavelmente as amostras antigas não conteriam o microorganismo viável e cultivável. Talvez, apenas traços residuais da bactéria poderiam estar presentes nos coprólitos.

O pó dos coprólitos, colhido assepticamente (0,1 grama) foi suspenso na solução de extração (1/10) agitado e incubado de acordo com o protocolo da técnica para realização do procedimento-teste (Biocontrol<sup>137</sup>).

Teste:

- 1- Na microplaca, seleciona-se o número de cavidades necessárias para as amostras a serem testadas, acrescidas de três outras, sendo duas para o controle positivo e uma para o controle negativo (branco).
- 2- De cada amostra pré-extraída, 100µL são depositados nas cavidades da placa, acrescentando-se também os controles positivos e deixando uma cavidade vazia (branco). Incubar a microplaca por 30 minutos a 35-37°C, sem agitar.
- 3- Após o período de incubação, enxaguar a microplaca com solução de lavagem (≅400mL) por três vezes, com o intuito de retirar o excesso de material orgânico, invertendo vigorosamente e batendo bem a placa com auxílio de papel toalha para retirar todo resto da amostra.
- 4- Adicionar em cada cavidade da microplaca 100µL da solução de conjugado, incluindo os controles positivos e na cavidade vazia. Incubar a placa por 30 minutos a 35-37°C, sem agitar.
- 5- Lavar três vezes com a solução de lavagem como no item 3, para retirar o excesso do conjugado.

- 6- Adicionar 100µL do substrato em todas as cavidades incluindo os controles positivos e negativo e deixar em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 10-15 minutos, realizando em seguida a leitura visual das placas utilizando o padrão de cores que acompanha o KIT. Amostras positivas apresentam coloração azul (figura 06).
- 7- Após a inspeção visual, adicionar 100µL da solução – “stop” nas cavidades da placa, verificando se a cor azul se torna amarela (figura 07). A microplaca é então lida com um aparelho leitor de ELISA com filtro de 450nm.

Os valores da densidade ótica (DO) do controle negativo (branco) foram utilizado na leitura para cálculo do Zero. O “Cutoff” foi calculado pela seguinte fórmula, aonde CLP1 e CLP2, são os controles positivos:

$((CLP1+CLP2)/2) \times 0,25 = \text{“Cutoff”}$  (Onde 0,25 e o valor de correção proposto pelo fabricante do teste – BioControl Systems, 2003 - Catalog N° 61001-96, 61001-504).

Espécimes, que produziram uma  $DO \geq$  maior que o “Cutoff” foram considerados positivos, de acordo com as instruções do fabricante.



Figura 06 – ELISA - Exemplo de leitura visual de resultados positivos

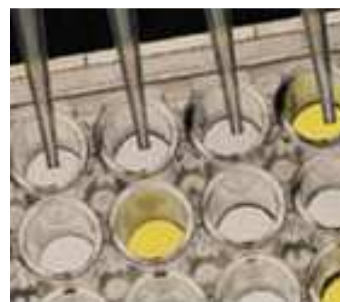


Figura 07 – ELISA - Exemplo de visualização de resultados positivos através do aparelho leitor ótico

### 3.2.3.2 – Processo convencional - Técnicas de cultivo

Na experimentação do cultivo bacteriano, inicialmente as amostras de coprólitos, foram tratadas com irradiação ultravioleta para eliminar a contaminação microbiana externa (30 minutos de cada lado) e em seguida manuseadas com total assepsia em câmaras de segurança biológica de classe II.

Experimentalmente, o mesmo processamento foi realizado com moldes de argila previamente autoclavados e contaminados com 10µL de uma suspensão

semelhante a metade do tubo 0,5 da escala de Mac Farland contendo esporos de *Brevibacillus laterosporus* fornecidos pelo Laboratório de Fisiologia Bacteriana do IOC em salina estéril. O experimento foi realizado em duplicata em câmara de segurança biológica de classe II.

A mesma quantidade da suspensão serviu para contaminar a superfície de outro molde, com o intuito de avaliar a eficiência da irradiação ultravioleta, que foi empregada nos coprólitos experimentais.

Esses moldes foram secos em estufa bacteriológica a 37°C protegido por gaze estéril até a completa evaporação do líquido presente (figura 08). Posteriormente o mesmo processo de retirada de material foi realizado.

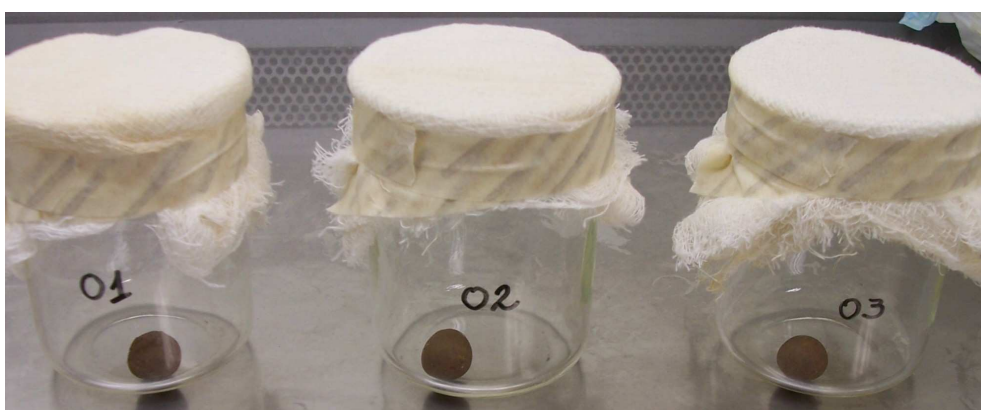


Figura 08 – Reprodução artificial de coprólitos em moldes em argila mantidos em estufa a 37°C para secagem.

Para a pesquisa microbiana em coprólitos, visando o isolamento de organismos aeróbios facultativos, principalmente do gênero *Bacillus* (Seward *et al*<sup>138</sup>, Shafaat *et al*<sup>139</sup>), foram utilizados meios líquidos e sólidos de acordo com a orientação de Gatson *et al*<sup>127</sup>. Assim, o material recolhido assepticamente da parte interna dos coprólitos foi semeado em frascos contendo 100mL de caldo infuso de cérebro e coração – BHI (Life Technologies, Rockville, Maryland, EUA) e incubado a 37°C durante 96 horas. No caso de crescimento visível, mesmo em tempo anterior, inóculos foram transferidos com alça de platina para Agar infuso de cérebro e coração e incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Nesta fase, a morfologia colonial foi observada, tomando como base precípua da contaminação primária do coprólito, a uniformidade do aspecto colonial (transparência ou opacidade, tonalidade, formas lisa ou rugosa, bordas regulares ou irregulares, elevação e espraiamento).



Diante de um quadro de uniformidade, três a cinco colônias foram isoladas e transferidas para tubos com 5 mL de BHI e incubadas a 37°C por 24-48 horas. Os crescimentos foram caracterizados morfológicamente pelo método de Gram e mantendo-se todos os isolados em ágar-estoque e em glicerol a - 4°C. Posteriormente, uma alíquota das amostras foi enviada ao Centro de Referência Nacional para Carbúnculo - LARENAC pertencente ao Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

### **3.2.4 - Confirmação da Posição Taxonômica das Cepas Bacterianas**

As cepas isoladas foram submetidas às provas bioquímicas, fisiológicas e citomorfológicas indicados para o estudo taxonômico do gênero *Bacillus* e gêneros correlatos, seguindo as recomendações preconizadas por Gordon e colaboradores<sup>140</sup>; Cowan e Steel<sup>141</sup>; Sneath e colaboradores<sup>142</sup> e Vasconcellos & Rabinovitch<sup>143</sup>.

Os testes bioquímicos e fisiológicos foram executados no Laboratório de Fisiologia Bacteriana/IOC- FIOCRUZ.

#### **3.2.4.1 - Identificação Citomorfológica**

##### **4.1.1 - Método de Coloração de Gram**

Foi realizado através da técnica clássica formulada por Hans Christian Gram (Koneman *et al*<sup>144</sup>).

##### **4.1.2 – Evidenciação do Esporo e do Corpo Paraesporal**

Foi realizado através da observação por microscopia óptica direta (contraste de fase), de montagem úmida contendo suspensão em água destilada entre lâmina e lamínula, de culturas de 48 horas de crescimento a 30°C em Ágar Nutriente. Observou-se a predominância do tipo de esporo elipsoidal ou cilíndrico; a posição do esporo no esporângio central, subterminal ou terminal; o esporângio quanto à sua deformação ou não, bem como a presença ou não de corpo paraesporal.

#### **3.2.4.2 – Caracterização Bioquímica**

Todos os testes bioquímicos e fisiológicos utilizaram meios de cultura contendo compostos orgânicos específicos e foram elaborados segundo as metodologias descritas

por Gordon e colaboradores<sup>140</sup> e Sneath e colaboradores<sup>142</sup>. As provas bioquímicas realizadas foram: reação de Voges-Proskauer (VP) para a pesquisa de acetil-metil-carbinol; pH no meio VM; redução de nitrato a nitrito; formação de ácidos a partir de açúcares (Glicose, Arabinose, Xilose, Manitol); produção de gás a partir de glicose; produção de hemólise em Agar sangue de carneiro; hidrólise de amido e caseína; liquefação da gelatina; utilização de citrato de sódio; degradação da tirosina; expressões das enzimas catalase e oxidase; produção da lecitinase e indol. Os fatores fisiológicos analisados foram: tolerância ao oxigênio e crescimento em presença de cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações (5%, 7% e 10%), prova do halofilismo (Koneman *et al*<sup>144</sup>).

### 3.2.4.3 - Análise Numérica

A distância entre as estirpes isoladas foi calculada com base no Coeficiente de Concordância Simples, onde se obteve a matriz de similaridade entre as estirpes. Este coeficiente é expresso através da seguinte fórmula  $SSM = \frac{a+d}{a+b+c+d}$ , onde numa comparação entre dois indivíduos (X) e (Y), a = número de caracteres coincidentemente positivos entre dois indivíduos em análise; b = número de caracteres presentes em (X) e ausentes em (Y); c = número de caracteres presentes em (Y) e ausentes em (X) e d = número de caracteres ausentes nos dois indivíduos em estudo (Pagano & Gauvreau<sup>145</sup>)

A matriz de similaridade obtida foi transformada em um dendrograma pelo método não ponderado de agrupamento aos pares (UPGMA), com o programa de análise numérica NTSys-pc (versão 2.1) segundo Rohlf<sup>146</sup>.

### 3.2.5 - Técnicas de Biologia Molecular

Para a pesquisa de bactérias por técnicas de biologia molecular nas amostras de coprólitos, foi adotado o mesmo cuidado de irradiação, neste caso com o intuito de evitar contaminação com DNA contemporâneo (Iñiguez *et al*<sup>92</sup>, Santos<sup>91</sup>). O material retirado de seu interior, sob a forma pulverizada foi mantido em frascos estéreis até a sua utilização.

As técnicas de Biologia Molecular foram realizadas diretamente no material retirado do coprólito e nas amostras obtidas após seu cultivo em meios de cultura ricos.

A extração e purificação do DNA total foram realizadas por métodos clássicos e por kits comerciais seguindo seus protocolos próprios, nos quais foram procedidas as técnicas da PCR e eletroforese em gel de agarose.

### **3.2.5.1-Extração do DNA**

Para a extração do DNA bacteriano, foram aplicados diferentes métodos com o intuito de avaliar a melhor eficácia. O método da extração por fenol-clorofórmio, o método utilizando Kits de extração e o método baseado no DNAZOL. Feitos alguns ajustes, estes protocolos se iniciam com o crescimento bacteriano em tubo plástico cônico (Falcon<sup>®</sup>) com 5 mL de caldo BHI, sendo que o inoculo inicial resultou do crescimento de apenas uma colônia. Após incubação overnight a 37°C, o crescimento bacteriano foi centrifugado a 4000 G por 10 minutos e o sobrenadante descartado seguindo as normas de biossegurança.

#### **3.2.5.1.1 -Extração pelo DNAZOL**

O DNAZOL é um reagente desenvolvido especificamente para o isolamento de DNA genômico. Baseado no uso da guanidina detergente (solução de lise) que hidrolisa RNA e ao mesmo tempo faz precipitação do DNA. (Chomczynski *et al*<sup>147</sup>). Em alguns casos usa-se uma modificação neste reagente que possibilita uma melhor atividade na extração a partir de células lisadas (DNAZOL BD). Em ambos os casos o protocolo é o mesmo, e com o intuito de testar várias técnicas, usou-se os dois reativos. (Mackey<sup>148</sup>)

Ao sedimento obtido, adiciona-se 500µL de DNAZOL, e o tubo permanece 60 minutos homogeneizando manualmente ou em agitador orbital. A seguir centrifuga-se a 10.000 G por 5 minutos, descartando o sedimento e transferindo o sobrenadante para outro tubo. O sedimento foi suspenso ½ volume de etanol absoluto e mantido à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) por 3 minutos. Após o período, centrifuga-se nas mesmas condições anteriores, desprezando o sobrenadante e lavando o sedimento 3 vezes com etanol a 70% para a limpeza da amostra. Elimina-se o sobrenadante e o sedimento seco é dissolvido em 8mM de NaOH, assegurando uma completa solubilização do DNA precipitado. Nesta fase, o material é estocado a  $-4^{\circ}\text{C}$ , sendo previamente determinada sua concentração através da densidade ótica. Utilizou-se de 200 a 500ng de DNA dissolvidos em 10mM Tris-HCl pH 8 na reação de PCR para um volume final de 50µl.

Este método (DNAZOL e DNAZOL BD) também foi utilizado diretamente com o material extraído de coprólitos, com adaptações no protocolo recomendado pelo fabricante. Ao pó do coprólito mantido em um tubo de microcentrífuga estéril, foi adicionado de 1ml de DNAZOL e a solução foi mantida por 1h, com homogeneização suave com o auxílio de uma pipeta. O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 10.000 G em temperatura ambiente e transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado adicionando-se ao tubo 0,5ml de etanol absoluto. O sedimento de DNA foi lavado com 1ml de etanol 95% por duas vezes, sendo centrifugado por 10 minutos a 10.000G a cada lavagem e ressuspendido em 8mM NaOH. Após determinar a concentração do DNA extraído, a amostra foi conservada em freezer até a realização da eletroforese.

### **3.2.5.1.2 -Método Fenol Clorofórmio**

A extração pelo fenol-clorofórmio é um dos métodos clássicos para obtenção de DNA. O fenol desnatura as proteínas removendo-as e permitindo que na fase aquosa se obtenha sais, carboidratos solúveis e DNA. O clorofórmio auxilia na separação da fase aquosa.

Para realização e avaliação desse procedimento, o pellet proveniente do crescimento bacteriano foi lavado com a adição de 1 mL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA pH 8,0 - 1mM). A lavagem se caracteriza por agitação suave, sem comprometer a integridade do sedimento celular, com o objetivo de retirar o meio BHI restante no tubo. O mesmo método foi realizado com o pó do coprólito a partir das seguintes etapas:

A suspensão das amostras em 900  $\mu$ L de TE e adição de 100 $\mu$ L de SDS 10%. A concentração final de SDS deverá ser sempre de 1% em relação ao volume final.

A primeira extração é realizada somente com fenol que é mais eficaz, mas na segunda e terceira utiliza-se o fenol-clorofórmio na proporção 1:1.

Nesse ponto transferem-se 700 $\mu$ L da solução de TE+SDS para um novo tubo, contendo 700  $\mu$ L de fenol tamponado. Agita-se a mistura e centrifuga-se por 5min a 10.000 G. Transfere-se o sobrenadante para outro tubo no qual adiciona-se 700  $\mu$ L de fenol-clorofórmio (350  $\mu$ L de fenol e 350 $\mu$ L de clorofórmio). A mistura após ser agitada cuidadosamente por inversão é centrifugada a 13000 G por 10 minutos. Separa-se a fase aquosa para um novo tubo limpo e seco e repete-se a extração orgânica, Ao

final, a operação é repetida apenas com clorofórmio (700 $\mu$ L) para a retirada de eventuais traços de fenol. O DNA se precipita após a adição de 10% acetato de sódio 3M e dois volumes de etanol absoluto. Incuba-se a mistura por 15 minutos em gelo, centrifugando em seguida a 13000 G por 15 minutos. Despreza-se o sobrenadante e lava-se com etanol 70% o sedimento correspondendo ao DNA genômico, centrifugando-o a 13000 G novamente por 10 minutos. A seguir, deve-se secar bem o pellet. O DNA após ressuspensão em 80  $\mu$ L de TE 1X é guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente realiza-se a eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando 10 $\mu$ L dessa solução.

### **3.2.5.1.3 - Método de extração e purificação através do KIT comercial GeneClean for Ancient DNA (BIO 101, La Jolla, CA)**

Nesta etapa efetuou-se uma tentativa de extração do DNA diretamente do pó do coprólito, utilizando um Kit de extração de DNA antigo. Segundo o fabricante, o Kit é adequado para o isolamento de até 20  $\mu$ g de DNA a partir de ossos, tecidos animais conservados, microrganismos do solo, bem como outros subprodutos de origem animal como as fezes, pois em virtude da possibilidade de contaminação por fontes externas de DNA contemporâneo, emprega-se especial atenção quando da produção dos reagentes do Kit, utilizando-se um fluxo laminar dedicado somente a este procedimento.

Seguindo o manual do Kit, cerca de 400mg do pó foram submetidos a agitação por cerca de 12h numa solução de hidratação com 5 $\mu$ L de EDTA 0,5M, 200 $\mu$ L de SDS 10% e 200 $\mu$ L de Proteinase K a 20mg/mL, em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida foi adicionado a cada amostra 1mL da solução A (DeHybernation) tendo como base a guanidina. O sistema foi mantido a  $60^{\circ}\text{C}$  por 4 horas e levado à centrifuga por aproximadamente 1 minuto a 13000 G. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual se adicionou 1,2mL de Glassmilk Ancient DNA e mais 3mL da solução A, mantendo-o sob agitação por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seqüência, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Ao sedimento foi adicionado 0,5mL da solução salton wash #1 e o mesmo foi então transferido para o filtro de centrifugação (SPIN Filter) pertencente ao Kit. Este tubo foi acoplado em novo tubo e centrifugado a 14000 G para lavagem do filtro. Posteriormente 0,5mL de salton wash #2 foi adicionado no tubo, e todo o procedimento foi repetido. Para limpeza do filtro adiciona-se por duas vezes 0,5mL de álcool do Kit e após uma centrifugação, esvazia-se o tubo, conservando-se o filtro. Uma terceira centrifugação foi realizada para a secagem

do filtro e o mesmo transferido para um tubo de diluição (Kit) no qual adiciona-se 50µL de solução de eluição (Kit), centrifugando-o por um minuto para transferência do material contido no filtro para o tubo e repete-se a operação. O DNA extraído foi mantido em temperaturas de -20°C (Freezer).

### 3.2.5.2- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído diretamente do coprólito ou obtido após cultura foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio da amplificação em um termociclador automático (Perkin Elmer, modelo 4800).

Os *primers* utilizados na experimentação foram definidos com base em seqüências conhecidas e utilizadas para os microrganismos de interesse, como no caso do gênero *Bacillus* (*rpoB1*, *rpoB2*, *EWA1*, *EWA2*, *GPR1*, *GPR2*, *GPR4*, *GPR5*) (Kim *et al*<sup>149</sup>), *Escherichia coli*, (*chuA1/chA2*, *yjaA.1/yjaA.2* e *tspE4C2.1/ tspE4C2.2*) (Clermont *et al*<sup>150</sup>) e também *primers* universais *29F*, *98R*; *338F*, *531R* para a pesquisa destes e de outros gêneros possivelmente presentes na amostra, como *Clostridium*, *Salmonella*, e outras bactérias entéricas (Ubaldi *et al*<sup>94</sup>).

Tabela 02 - Primers usados para PCR neste estudo.

Nomenclatura dos Primers*	Seqüência dos Oligonucleotídeos
EWA-1.....	5'-TATGGTTGGTATTGCTG-3'
EWA-2.....	5'-ATGGTTCCGCCTTATCG-3'
GPR-1 .....	5'-CGTAGTTCACGAACTGCATCT-3'
GPR-2 .....	5'-ATGATGTATCTAATGCGGCGT-3'
rpoB1 .....	5'-CGTGTTATCGTTTCCCAGC-3'
rpoB2 .....	5'-AAGATGATCGATATCATCTG-3'
29F.....	5'-TGGCTCAGATTGAACGCTG-3'
98R.....	5'-CCAGACATTACTACCCGTCC-3'
338F .....	5'-AACTGAGACACGGTC CAGAC-3'
531R .....	5'-ACGCTTGCACCCTCCGTATT-3'
ChuA.1.....	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'
ChuA.2.....	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'
YjaA.1.....	5'-TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG-3'
YjaA.2.....	5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'
TspE4C2.1.....	5'-GAGTAATGTGCGGGGCATTCA-3'
TspE4C2.2.....	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'

### 3.2.5.2.1 - Reação com o primer *rpoB*

De acordo com Qi e colaboradores<sup>151</sup> as seqüências de primer *rpoB1* (5'-CGTGTATCGTTTCCCAGC-3') e *rpoB2* (5'-AAGATGATCGATATCATCTG-3'), foram derivadas das duas regiões conservadas e correspondem a nucleotídeos (nt) 1482 a 1500 e de 2281 a 2300 do gene *rpoB* de *Bacillus subtilis* (GenBank acesso nº L24376). A reação da PCR consistiu na mistura de 50 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 75 mM, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 0,2 mM, 1 mM (cada) e primers *rpoB1* e *RpoB2*, 0,05U de AmpliTaq DNA polimerase/ml e 100 ng de DNA modelo. A amplificação foi realizada no termociclador, sendo que as condições usadas no ciclo foram as seguintes: inicialmente uma desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 45°C durante 1 minuto, e 72°C durante 1 minuto, com uma extensão final de 72°C durante 7 minutos.

A partir de reações de baixa estringência, espera-se, a produção de amplicons com um tamanho de 819 pb (Qi *et al*<sup>151</sup>).

### 3.2.5.2.2 - Amplificação baseada em iniciadores VNTR (Kim *et al*<sup>149</sup>)

“Variable number of tandem repeats” ou número variável de repetições em série, é uma metodologia que se baseia na existência de uma seqüência repetitiva específica em diferentes indivíduos de uma população ou nos dois homólogos diferentes do cromossoma num indivíduo diplóide. Apesar do método não ser adequado para amostras antigas, pois requer DNA íntegro, fez-se a aplicação experimental no material colhido da amostra do coprólito, assim como nos respectivos isolados bacterianos, tendo em vista que não se tinha um alvo específico. A amplificação VNTR foi realizada com os primers EWA-1 (5'-TATGGTTGGTATTGCT-3') e EWA-2 (5'-ATGGTTCCGCCTTATCG-3'), descritos por Andersen *et al*<sup>152</sup>. A reação de PCR foi feita em 100µl contendo 50 ng de DNA modelo, 20 pmol de cada primer, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 10 µl de tampão 10X com 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de DNA Taq polimerase (Roche MB, Mannheim, Alemanha). A mistura de cada reação foi desnaturada a 94°C durante 2 minutos e correu durante 35 ciclos usando um termociclador (Perkin Elmer, modelo 4800), com os seguintes perfis de temperatura: desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. O último ciclo incluído por 5 minutos a 72°C para completar extensão.

### **Amplificação do VNTR por primers flanqueadores.**

Regiões VNTR de cerca 1,1 kbp foram amplificadas por PCR usando os primers flanqueadores GPR-1 (5'-CGTAGTTCACGAACTGCATCT-3') e GPR-2 (5'-ATGATGTATCTAATGCGGCGT-3'). Os produtos do PCR foram purificados utilizando Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencia, CA, E.U.A.). As seqüências VNTR foram visualizadas em gel de agarose 1% e determinadas pelo uso de BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 kit e ABI 310 DNA seqüência automática (Applied Biosystems, Norwalk, CN, E.U.A.).

#### **3.2.5.2.3 Amplificação específica para *E.coli***

A detecção dos genes chuA.1/chA.2, yjaA.1/yjaA.2 e TspE4C2.1/ TspE4C2.2, que geram fragmentos de 279, 211 e 152 pares de base, foi realizada através de ensaios de amplificação simultânea dos genes (PCR-triplex). Estes genes são especificamente relacionados às amostras de *Escherichia coli* e servem não só para sua detecção como para seu agrupamento filogenético (Clermont *et al*<sup>150</sup>). Estes testes foram realizados com o material extraído direto do coprólito, em cooperação com a pesquisadora Adriana Régua do DCB – ENSP.

#### **3.2.5.2.4 Amplificação por primers universais.**

Seguindo as recomendações de Ubaldi *et al*<sup>94</sup>, foram realizadas amplificações a partir de um conjunto universal de primers direcionado para o RNA ribossomal 16s (16s rDNA) sendo empregados os iniciadores: 29f: (5'-TGGCTCAGATTGAACGCTG-3'); 98r: (5'-CCAGACATTACTCACCCGTCC-3'); 338f: (5'-AACTGAGACACGGTCCA GAC-3') e 531r: (5'-ACGCTTGCACCCTCCGTATT-3'). As reações de PCR foram realizadas em 50 µL com uma mistura contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,1 mg / mL de gelatina, 200 µM dNTPs (cada), 300 ng de cada primer, 2,5 unidades de enzima Taq polimerase, e 1 µL de DNA. Um primeiro passo de 5 min a 94°C foi realizado para desnaturar o DNA genômico, e em seqüência, a desnaturação foi fixada em 94°C durante 60s, o anelamento realizado durante 30s em 60°C para os primers 29f-98r e de 56°C para os primers 338f-531r. A fase de alongamento foi a 72 °C durante 60s. Salienta-se que foram efetuados quarenta ciclos de amplificação para cada reação de amplificação.



### 3.2.5.2.5-Análise dos produtos da PCR

Após a reação da polimerase em cadeia (PCR), 10µL de todos os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Em seguida a etapa de corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (Sigma, St. Louis, IL, EUA) numa concentração de 0,5 mg/mL, seguindo-se a leitura em sistema de transiluminação (Sambrook *et al*<sup>93</sup>). A fotografia digital do gel e das bandas de DNA separadas eletroforeticamente foi realizada em aparelho tipo Gel Doc UVP GDS 7.500 (Gel Documentation System, Califórnia, EUA).

Posteriormente, foram utilizadas outras técnicas de biologia molecular, como a técnica de Hibridação do DNA (Marranzano *et al*<sup>153</sup>, Sambrook *et al*<sup>93</sup>) a técnica da clonagem (Sambrook *et al*<sup>93</sup>) e seqüenciamento do DNA obtido, como complementares ao estudo (Messing *et al*<sup>154</sup>).

### 3.2.5.3-Hibridação do DNA

#### Hibridação do DNA nas Membranas de Nylon

A técnica de hibridação é importante para a confirmação dos resultados visualizados sob luz UV do gel de agarose corado pelo brometo de etídio e também por aumentar o sinal dos produtos amplificados em cerca de 100 vezes (Sambrook *et al*<sup>93</sup>).

As membranas foram colocadas em solução de BLOTTO a 60°C, por duas horas, para pré-hibridação. A solução de BLOTTO (Bovine lacto transfer technique optimizer) é composta de SSC 1,5 X (SSC 20X: citrato de sódio 0,3 M, cloreto de sódio 3,0 M), SDS 1% (lauril sulfato de sódio), NFM 0,5% (non fat milk - agente bloqueador).

As sondas (1 mL) usadas foram feitas com primers específicos marcadas com fósforo radioativo ( $a^{32}P$  - dATP -800Ci/mmol) e com um *primer* randômico (1 ml) e (7 ml) de água destilada, (3 ml) de DNTP 0,5 mM, (2 ml) de *buffer* 10X *Klenow* e 5U (1 ml) de *klenow* DNA polimerase (enzima DNA polimerase I de *E.coli* "Large Fragment"). A sonda preparada foi submetida a 95°C por cinco minutos (denaturação) e imediatamente colocada em banho de gelo. A sonda foi adicionada à solução de BLOTTO com as membranas e a hibridação ocorreu durante incubação a 60°C, no período de 12 horas.

Após a hibridação as membranas foram lavadas com uma solução de lavagem (SSC 1X, SDS 0,5% e água destilada), por duas vezes, em temperatura ambiente, e uma vez, a 60°C, por 30 minutos em banho-maria com agitação. Após as lavagens a radiação foi verificada com contador Geiger para se avaliar a necessidade de outras lavagens.

As membranas parcialmente secas foram envoltas em filme plástico e colocadas em cassete próprio para sensibilizar filme de Raio-X (Kodak-X-OMat<sup>®</sup>). A exposição foi no mínimo de 12 horas, à temperatura de -70°C. Finalizando, procedia-se à revelação manual do filme de RX em sala escura e verificação do sinal da hibridação.

#### **3.2.5.4-Clonagem gênica**

A clonagem gênica é o processo de obtenção de múltiplas cópias de um gene que possibilitem a manipulação química. A clonagem biológica de um gene consiste em inserí-lo em um vetor que, no presente ensaio, esteve representado por um plasmídeo bacteriano conhecido. O plasmídeo, constituído somente de DNA, possui a capacidade de se multiplicar dentro de sistemas vivos com as bactérias. Cada bactéria tem a capacidade de carregar múltiplas cópias do plasmídeo que contém o gene clonado inserido. Portanto, a análise e o isolamento de colônias bacterianas transconjugantes presentes no meio sólido favorece o estudo, pois cada colônia bacteriana é composta de várias células idênticas (clones), isto é, proveniente de uma única célula “mãe”. Com tal processo foi possível por meio de uma série de reações químicas, denominadas “miniprep” (mini-preparação), obter número suficiente de cópias desse gene para manipulações químicas futuras.

##### **3.2.5.4.1 - Obtenção de bactérias quimicamente competentes**

###### Pré-inóculo

Em tubo cônico “Falcon” de 50 mL, foram adicionados 5 mL de caldo LB (Luria-Bertani) e 5 µL de um crescimento de *Escherichia coli* linhagem TOP10 (Invitrogen Life Technologies, California, USA) e incubada a 37°C durante 12 horas num homogeneizador automático (≈ 150 rpm).

###### Inóculo

Cinco mL do crescimento do pré-inóculo foram colocados em 500 mL de meio LB líquido e mantidos a 37°C em constante aeração durante 3 horas (A600/0,5). A

estabilização do crescimento foi obtida pelo resfriamento em banho de gelo e a cultura distribuída em tubos, imediatamente centrifugados durante 5 minutos em 5.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi escoado completamente e o pellet ressuscitado em 30 mL de 100 mM de CaCl<sub>2</sub> gelado. Após a fase de repouso de 30 minutos, a suspensão de células foi centrifugada a 5.000 rpm durante 7 minutos a 4°C sendo desprezado o sobrenadante. O pellet foi ressuscitado em 4,14 mL de 100 mM de CaCl<sub>2</sub> gelado e 860 µL de glicerol a 87%. As amostras foram estocadas em alíquotas de 200 µL em tubos tipo “eppendorf” e mantidos a -80°C até o momento do uso.

#### 3.2.5.4.2 Clonagem

Seguindo as sugestões de Sambrook e colaboradores<sup>93</sup>, uma colônia de *E. coli* TOP10 foi transferida para 5 mL de caldo LB acrescido do antibiótico seletivo para o plasmídeo utilizado (ampicilina – 50µg/mL). Esta etapa consistiu em realizar uma reação de transformação com um plasmídeo controle (PUC19), com o intuito de verificar a competência das células. Como o plasmídeo produz uma enzima que degrada o antibiótico, a sua presença possibilita que somente as bactérias contendo o plasmídeo se multipliquem. A semeadura foi realizada em Agar LB adicionado de 50µg/mL de ampicilina após autoclavação; este meio já solidificado é previamente tratado com X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) e IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) e somente depois de cerca de 20 minutos a 37°C realiza-se a semeadura (TOPO TA Cloning<sup>®</sup> - Invitrogen).

O método visa caracterizar se os plasmídeos adquiriram ou não o material genético (inserto), considerando que a *E. coli*, normalmente não produz β-galactosidase. Aquelas, portadoras de plasmídeos com gene lacZ, que codifica esta enzima, passam a ser capazes de produzir beta-galactosidase, visualizando-se no meio sólido, colônias azuis. Tal tonalidade é resultante da presença do X-Gal (cromógeno) alterado pela β-galactosidase, induzida pelo IPTG. Salienta-se que o processo só ocorre naquelas colônias sem inserto alvo, tendo em vista que este interrompe a sequência que codifica a enzima beta-galactosidase, impedindo posteriormente o desenvolvimento da cor azul (crescimento de colônias brancas – bactérias possuidoras de plasmídeo recombinante).

A reação de clonagem dos produtos de PCR foi realizada com o TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies, California, USA), seguindo as instruções do fornecedor. Este Kit propicia a clonagem pela inserção direta dos

produtos amplificados pela Taq em um plasmídeo vetor (figura 10) que possui uma Timina 3' simples aonde ocorre a ligação com a Adenina na extremidade 3' do produto final (material que se deseja clonar).

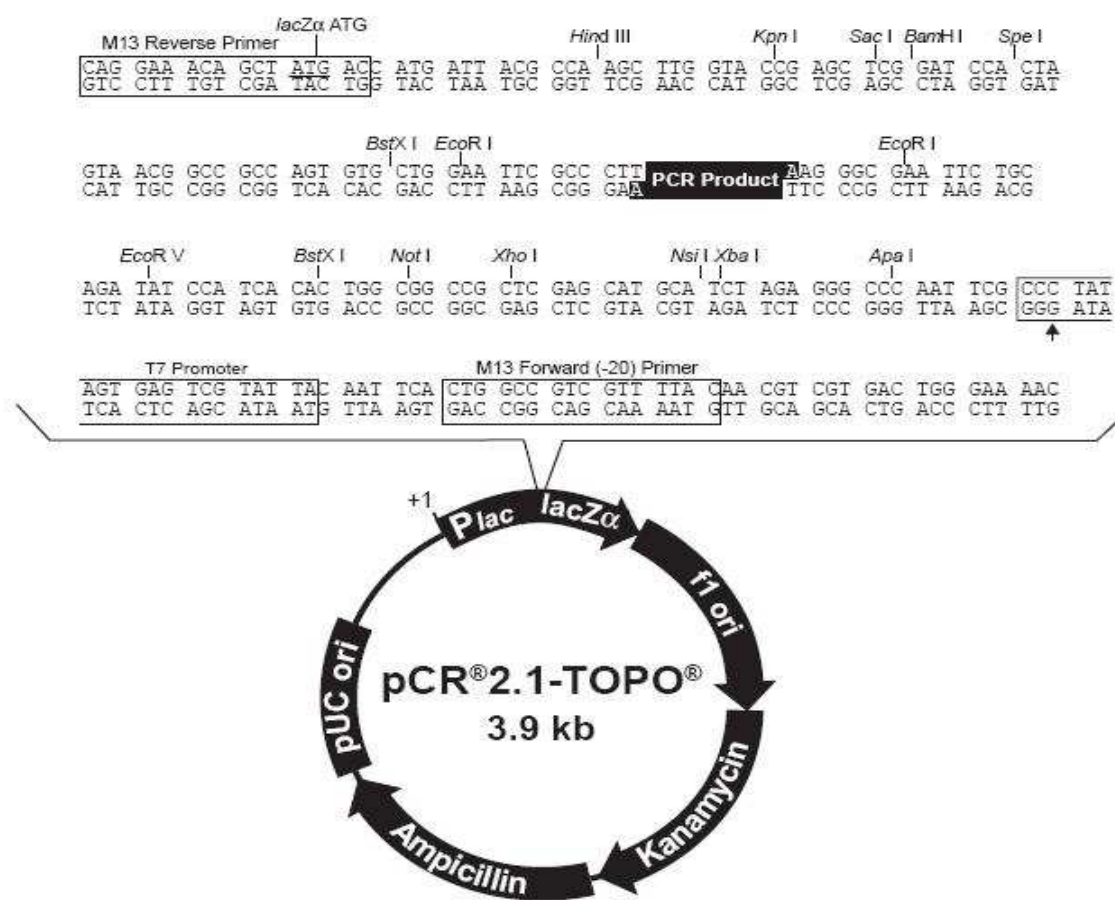


Figura 09 - Topo TA utilizado na experimentação da clonagem

Para a reação de clonagem foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de produtos de PCR provenientes das amostras isoladas dos coprólitos, 0,5  $\mu\text{L}$  de solução de sal (1,2 M NaCl e 0,06 M  $\text{MgCl}_2$ ) e 0,5  $\mu\text{L}$  do vetor de clonagem pCR® 4 TOPO. A mistura foi suavemente homogeneizada e incubada em temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) durante 15 minutos, seguindo as instruções do fornecedor.

#### Preparação da Transformação Bacteriana

Foram adicionados 3  $\mu\text{L}$  da reação de clonagem em tubo com 200  $\mu\text{L}$  do crescimento/suspensão de *E. coli* competentes (linhagem TOP10) e colocado em banho de gelo por 15 minutos. Após choque térmico durante 1 minuto a  $42^\circ\text{C}$ , o material foi transferido para o banho de gelo. Em seguida, 800  $\mu\text{L}$  de caldo LB foi inoculado no sistema com a solução de transformação e incubado a  $37^\circ\text{C}$  durante 50 minutos. Finda

esta etapa cada solução foi distribuída em 2 placas contendo agar LB com ampicilina, Xgal e IPTG e incubadas a 37°C.

As colônias recombinantes são claras, enquanto que aquelas em que não houve o fenômeno da transformação desenvolvem a coloração azul.

Inicialmente, realizamos a clonagem de cada amostra com os produtos da sua PCR em separado (rpoB e EWA), depois por motivo de economia procedemos a clonagem de cada amostra com um mix das PCRs realizadas com os diferentes primers (Universais e GPR).

#### **3.2.5.4.3 - Manutenção e cultivo bacteriano com os plasmídeos recombinantes**

Em cada 3,6 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de ampicilina distribuído em tubo de ensaio, foi inoculada uma colônia bacteriana recombinante e incubada em homogeneizador tipo orbital durante 12 horas a 37°C. Em seguida, em tubo tipo “ependorf”, foram transferidos 600 µL do crescimento bacteriano e acrescido de 700 µL de glicerol a 87%. O material foi estocado a -80°C (Sambrook *et al*<sup>93</sup>).

#### **3.2.5.4.4 - Mini-preparação de plasmídeos recombinantes (Método de lise alcalina e Kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep)**

##### Ressuspensão da bactéria

Em condições de assepsia e esterilidade, se fez a transferência de 1,5 mL da cultura para um tubo tipo “ependorf”, que foi centrifugado a 12.000 rpm durante 30 segundos. Mantendo sempre o tubo no banho de gelo, o sobrenadante foi descartado e o volume de sedimento foi aumentado pela repetição da operação. O resíduo final do sobrenadante foi removido com o auxílio de papel absorvente (Sambrook *et al*<sup>93</sup>) e o pellet foi mantido em freezer a -20°C até a etapa de extração do plasmídeo.

##### Método de Lise Alcalina

A lise alcalina é um dos procedimentos mais usados para a extração rápida de plasmídeos bacterianos. Consiste na utilização de três soluções: I, II e III e subsequente precipitação do DNA plasmidiano com álcool isopropílico, para concentrá-lo. A solução I contém tampão (TrisHCl), um quelante de Mg<sup>++</sup> e Ca<sup>++</sup> (para impedir seu uso como ativador de DNase) e glicose. A solução II é ativa na lise e contém NaOH e um agente

de solvatação SDS (dodecilsulfato de sódio). Com a ação da solução II as proteínas sofrem desnaturação parcial e o SDS liga-se a elas misturando sua cadeia alifática ao cerne hidrofóbico das proteínas semi-desnaturadas. O DNA da bactéria não se desliga das proteínas semidesnaturadas e é alvo de precipitação pela ação da solução III, que contém  $K^+$ . O sal de  $K^+$  do SDS precipita prontamente, levando consigo o DNA bacteriano e deixando o plasmídeo no sobrenadante. Esse é precipitado mudando-se a constante dielétrica do meio com álcool; isto pode ser feito com o uso de 1 volume de isopropanol ou com 2 volumes de etanol. Opcionalmente, antes desta precipitação, pode-se fazer uma extração com solvente orgânico. Neste caso mistura-se igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25: 24: 1 ou clorofórmio: álcool isoamílico 24:1. Centrifuga-se para separar a fase orgânica (inferior) da fase aquosa (superior) retirando-a com cuidado para evitar as proteínas desnaturadas pelo fenol que estão contidas na interface da mistura.

Em cada amostra bacteriana foram adicionados 200  $\mu$ L da Solução I (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA 0,5 M; 400  $\mu$ g/mL RNase), e ressuspendido o sedimento fazendo refluxos com a micropipeta, além de manter no gelo por 1 min. Depois incorpora-se 200  $\mu$ L da Solução II para a lise (0,2 N NaOH; 1% SDS) misturando e agitando por inversão cuidadosa do tubo por 4 vezes para minimizar a fragmentação do DNA cromossômico bacteriano ou este contaminará a preparação plasmidiana. Manter em gelo por 5 min. A solução II deve ser preparada na hora, adicionando-se a um tubo 4,3 ml de água destilada, 200  $\mu$ l de NaOH 5N e 500  $\mu$ l de SDS 10% p/v.

Na fase subsequente, adicionar 200  $\mu$ L da solução precipitadora III (5 M K ( $C_2H_3O_2$ ); 99,7%  $C_2H_4O_2$ ;  $H_2O$  MilliQ autoclavada) e misturar por inversão cuidadosa do tubo por 4 vezes, observando a formação do precipitado. Centrifugar por 5 min a 12000G transferindo-se o sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga tendo o cuidado de não pipetar o material branco em suspensão, pois contém o DNA cromossômico bacteriano que se quer eliminar.

O “pellet” foi ressuspendido com 600  $\mu$ L de isopropanol 95% (igual volume) para precipitação da amostra e em seguida, realiza-se uma série de três lavagens com o uso de agitador de tubos tipo Vortex por 1 min com EtOH 70% para retirada do sal presente no precipitado. Concluída a purificação do DNA plasmidial, o “pellet

ressuspensão em 50 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) foi estocado a -20°C (Sambrook *et al*<sup>93</sup>).

Recorrendo-se ao Kit de extração de plasmídeos PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit o processo é realizado no tempo de 30 a 40 minutos, sendo usado para isolamento com alta qualidade de até 30 µg de DNA plasmidial proveniente de *E. coli*. As células bacterianas são lisadas e aplicadas a uma coluna com membrana de sílica (spin) que se liga seletivamente ao DNA plasmidial. Contaminantes são removidos com tampões de lavagem e o DNA plasmidial extraído e purificado é eluído em tampão TE.

### **Método PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit**

#### **Preparo do lisado de células bacterianas**

A partir do sedimento (pellet) obtido por centrifugação de 1-5 ml de uma cultura overnight (1-2 x 10<sup>9</sup> *E.coli* em caldo LB) do qual o meio de cultura foi cuidadosamente removido, adiciona-se 250 µL do tampão de resuspensão (R3), com RNase A e homogeneiza-se, de forma a dissociar completamente o sedimento. Em seguida adiciona-se 250 µL de tampão de Lise (L7), misturando suavemente e invertendo o tubo por cinco vezes sem usar o agitador. Manter incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, sem exceder este tempo.

Como próximo passo adicionar 350µL do tampão de precipitação (N4), misturando imediatamente invertendo o tubo até a solução ficar homogênea. Em sedimentos mais volumosos agitar vigorosamente, mas sem usar o agitador tipo vortex.

Centrifugar a mistura a ~ 12000 G por 10 minutos à temperatura ambiente usando uma Microcentrifuga para clarificar e purificar, eliminando os detritos da lise.

Para ligar o DNA, o sobrenadante é colocado na coluna Spin e esta encaixada em tubo de lavagem de 2ml.

Centrifugar a ~ 12.000 G por 1 minuto. Desprezar o sobrenadante e recolocar a coluna novamente no tubo de lavagem.

Adicionar 500 µL do tampão de lavagem (W10), com etanol na coluna. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a ~ 12.000 G por 1 minuto e descartar

o fluxo recolocando a coluna novamente no tubo de lavagem. Assinala-se que essa conduta é recomendada quando da utilização endA + Estirpes.

Adicionar a coluna 700 µL do tampão de lavagem (W9) com etanol e centrifugar a ~ 12000 G por 1 minuto. Eliminar o sobrenadante recolocando a coluna novamente no tubo de lavagem. Finalmente centrifugar a coluna a ~ 12000 G por 1 minuto para remover qualquer resíduo do tampão de lavagem (W9) com etanol, descartando o tubo de lavagem com o líquido contido no seu interior. A coluna será reservada para a etapa da eluição do DNA.

Como primeiro passo desta fase, a coluna foi colocada num tubo eppendorf de 1,5 mL de capacidade (tubo de recuperação), adicionando-se 75 µL de tampão TE pré-aquecido a 65-70 °C em direção ao centro da coluna. Salienta-se que o aquecimento é facultativo para eluir DNA de 1-30 kb, mas é recomendado para DNA maior que 30 kb.

Em seqüência, a coluna é mantida por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada a ~ 12.000 G durante 2 minutos. Finalizando, descartar a coluna e reservar o tubo de recuperação que contém o DNA plasmidial purificado.

No armazenamento do DNA por prazo longo, mantê-lo a -20°C e para aplicação imediata, conservá-lo a 4°C. É importante evitar os repetidos descongelamentos e congelamentos.

#### **3.2.5.4.5 - Analisando o Rendimento do DNA:**

A quantidade de DNA plasmidial pode ser estimada usando kits comerciais, como o Kit Quant-iT™ DNA Assay (Invitrogen) ou por absorvância UV.

Este kit permite um rápido, sensível e específico método de quantificação de DNA por fluorescência, fornecendo um reagente de quantificação com DNA modelo para a curva padrão e tampão pré-fabricado para a quantificação do DNA plasmidial.

Normalmente o DNA purificado utilizando PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit tem  $A_{260}/A_{280} > 1,80$  quando as amostras são diluídas em Tris-HCl (pH 7,5), indicando que o DNA é razoavelmente limpo das proteínas que possam interferir nas aplicações. A ausência de contaminação do DNA e do RNA pode ser confirmada por eletroforese em gel de agarose.



Posteriormente, o DNA plasmidiano purificado é concentrado por precipitação com 2 volumes de etanol absoluto ou 1 volume de isopropanol. O sedimento contém sais que podem ser retirados com uma lavagem do sedimento, agitando-se o mesmo em etanol 70%. Isso consiste na lavagem do sedimento, uma vez que o DNA não pode ser solubilizado em etanol. O DNA é ressuspensionado em tampão apropriado - TrisHCl 10 mM EDTA 1 mM, sendo função do Tris, manter o pH e do EDTA, quelar  $Mg^{++}$  e  $Ca^{++}$  necessários para a ação de enzimas degradadoras de DNA, que fica portanto protegido.

#### Verificação da incorporação do DNA ao plasmídeo pela migração em gel

Para observar a migração do DNA plasmidial, que vai auxiliar na escolha das amostras para o seqüenciamento, é importante acrescentar ao material que se pretende pesquisar, no momento da corrida eletroforética, o tampão da amostra. A sua função por conter glicerol, é aumentar a viscosidade da amostra além de adicionar cor a mesma, para que possa ser aplicada mais facilmente e permitir o monitoramento da eletroforese, pois, o corante é negativo, e migra junto com a amostra para o pólo vermelho (positivo).

Como padrão para o gel, foi utilizado o material extraído somente do plasmídeo sem o inserto, obtido de uma colônia azul (significando que não houve inserção de material durante a transformação).

Em síntese, para clonar um gene por meio de um plasmídeo recorre-se as seguintes manobras (Figura 10):

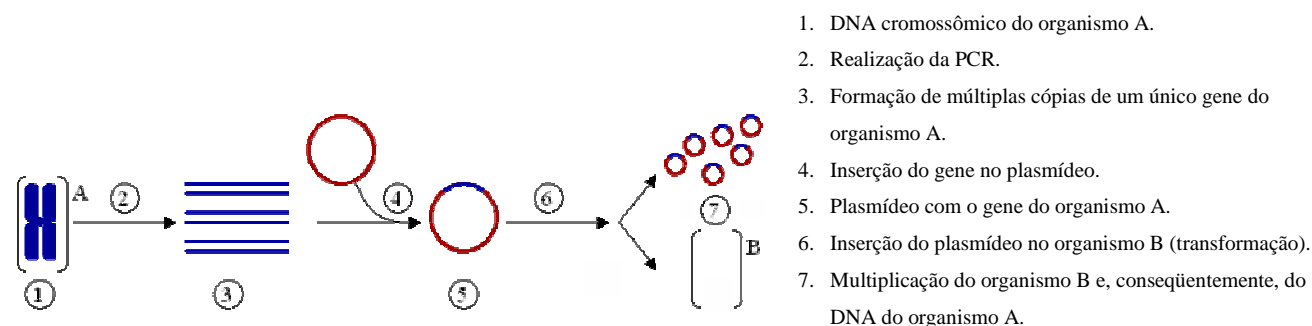


Figura 10 – Fluxograma das Etapas da Clonagem Gênica Plasmidial.

#### **3.2.5.5--Sequenciamento**

Inicialmente, foi utilizada a técnica de seqüenciamento direto, lançando mão do produto proveniente das reações de PCR realizadas nas amostras bacterianas isoladas.

Todavia, os resultados obtidos não foram satisfatórios, razão pela qual foi adotada a técnica a partir da aquisição dos clones.

Todos os clones obtidos e selecionados de acordo com as reações iniciais de PCR foram utilizados na reação de seqüenciamento usando os primers de cada PCR original. A reação foi realizada de acordo com o Kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing e os produtos foram purificados usando EtOH/EDTA (Applied Biosystems, California, USA), ambos os métodos seguindo as instruções do fornecedor. Todas as amostras foram analisadas através do seqüenciador automático (DNA – ABI Prism 3730) sob condições dependentes do sistema de seqüenciamento utilizado, e as seqüências foram examinadas e editadas usando o programa ChromasPro Version 2.33 ([www.techne.lysium.com.au/ChromasPro.html](http://www.techne.lysium.com.au/ChromasPro.html)).

#### Análise de seqüências nucleotídicas

As seqüências foram alinhadas e analisadas usando o programa Mega (Tamura *et al*<sup>155</sup>).

O vetor usado foi identificado e desconsiderado dentro das seqüências resultantes. Posteriormente, as seqüências foram analisadas a partir do primer usado. Para as células transformadas a partir de vários resultados de PCR (mix) foi necessário avaliar qual dos iniciadores havia se ligado com base naqueles utilizados para a amplificação (Tabela 03):

Tabela 03 – Iniciadores utilizados para amplificação através da PCR que originaram os produtos clonados analisadas no sequenciamento.

<i>rpoB</i>	1- 5'-CGTGTTATCGTTTCCCAGC-3'	2- 5'-AAGATGATCGATATCATCTG-3'
<i>EWA</i>	1- 5'-TATGGTTGGTATTGCT-3'	2- 5'-ATGGTTCCGCCTTATCG-3'
<i>GPR</i>	1- 5'-CGTAGTTCACGAACTGCATCT-3'	2- 5'-ATGATGTATCTAATGCGGCGT-3'
Universais	29f: 5'-TGGCTCAGATTGAACGCTG-3'	98r: 5'-CCAGACATTACTACCCGTC-3'
Universais	338f: 5'-AACTGAGACACGGTC CAGAC-3'	531r :5'-ACGCTTGACCCCTCCGTATT-3'

Após a análise visual de cada uma das seqüências obtidas e a exclusão manual do vetor de clonagem, as seqüências resultantes foram separadas por primers e submetidas a ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al*<sup>156</sup>, NCBI BLAST<sup>157</sup>). A ferramenta BLAST é bastante utilizada em projetos de pesquisa na área de bioinformática, auxiliando no processo de comparação de seqüências biológicas e busca por homologias, uma atividade extremamente importante

na biologia molecular. A realização de busca por similaridades permite que, quando encontradas, sejam indicadoras de uma alta probabilidade de se encontrar funções análogas entre as seqüências. Esta ferramenta compara através de algoritmos a seqüência de consulta com todas as seqüências do banco de dados e retorna um relatório informando detalhes de similaridade das seqüências do banco. A primeira parte do relatório lista todas as seqüências da base de dados que possuem alta similaridade, também chamadas de hits, com a seqüência de consulta. Para cada hit, é agregada uma pontuação (score) que quantifica o grau de similaridade entre as duas seqüências. Esta pontuação, assim como todas as seqüências similares, é obtida a partir de heurísticas e aproximações que a ferramenta BLAST utiliza para obter os melhores alinhamentos pontuais, com um tempo de execução bem reduzido. Para dar credibilidade aos seus resultados, ao lado de cada valor de score é fornecido o e-value, que fornece aos usuários a segurança de que a pontuação dada para um determinado hit não ocorreu aleatoriamente. Desta forma, quanto mais próximo de zero for o e-value, mais garantida será a consulta (Sousa & Lifschitz<sup>158</sup>).

## 4. RESULTADOS

A criação do banco de dados foi realizada com sucesso, o que auxiliou nossa pesquisa desde o início. Este banco encontra-se hoje acessível à comunidade científica mediante senha de acesso liberada pela curadoria. A título de avaliação encontra-se disponível em: <http://documents.google.com/?hl=pt-BR>, identificação de usuário: Paleoparasitologia; senha: ludovico.

### 4.1 – Procedimentos de avaliação da esterilização por ultravioleta

A utilização do coprólito experimental permitiu constatar a relevância da utilização da luz ultravioleta como esterilizante superficial, evidenciando após irradiação dos moldes de argila, de ambos os lados por 30 minutos apenas o crescimento e isolamento de *Brevibacillus laterosporos* do conteúdo interno.

### 4.2 – Procedimentos realizados diretamente do material obtido do coprólito.

Os métodos sorológicos, de extração, amplificação e de hibridação do DNA realizados diretamente do material interno retirado do coprólito, não permitiram resultados satisfatórios, por diversos fatores a serem comentados na discussão.

No método convencional do cultivo do material interno dos 14 coprólitos examinados, nove espécimes revelaram crescimento bacteriano no meio líquido após incubação a 37°C por 24h a 48h. O isolamento foi obtido pela transferência para meio sólido, que evidenciou o nível de pureza e uniformidade pelo aspecto da morfologia das colônias crescidas. De cada placa foram selecionadas e transferidas duas a seis colônias, para o meio líquido.

Os coprólitos que revelaram crescimento bacteriano, com as respectivas origens e número de colônias isoladas foram catalogados na Tabela 04.

Tabela 04: Amostras de coprólitos que revelaram crescimento em meios líquidos e sólidos com os respectivos números de colônias isoladas.

Coprólito de origem	Local do sítio	Nº de colônias isoladas	Identificação da amostra
30a	Unai/MG/Brasil	3	30a (1), 30a (2), 30a (3)
31a	Unai/MG/Brasil	4	31a (1), 31a (2.1)*, 31a(2.2)*, 31a (3)
31b	Unai/MG/Brasil	2	31b (1), 31b (2)
32a	Unai/MG/Brasil	2	32a (1.1)•, 32a (1.2)
34a	Unai/MG/Brasil	1	34a(1)•
35a	Unai/MG/Brasil	3	35a (1)•, 35a (2), 35a (3)
930	S.R.Nonato/Piauí/Brasil	2	930 (1), 930 (2)
956	S.R.Nonato/Piauí/Brasil	1	956
1224	S.R.Nonato/Piauí/Brasil	3	1224 (1), 1224 (2), 1224 (3)

\* - Aparentemente constituído de um único tipo de colônia, que após o reisolamento revelou dois tipos morfológicos coloniais

• - Amostras que não sobreviveram após o primeiro repique.

#### 4.2 – Características Citomorfológicas

Considerando os aspectos macroscópicos das colônias crescidas, a suspeita imediata recaiu para os membros do gênero *Bacillus*. Com os isolados em meios líquido e sólido foi efetivada a análise morfotintorial, através da coloração pelo método de Gram, em que se procurou considerar os arranjos celulares (isolados ou em cadeia), formato do endósporo e sua posição esporângio, se deformante ou não. Os dados completos obtidos nesta análise estão descritos a seguir e reunidos na tabela 05.

**30a(1)** - Grandes bastonetes, cadeias curtas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio não-deformante. Gram-positivo. Com corpo para-esporal (cristal protéico).

**30a(2)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição terminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**30a(3)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição lateral, esporângio deformante. Gram-positivo.

**31a(1)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição central, esporângio deformante. Gram-positivo.

**31a(2.1)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição terminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**31a(2.2)**- Grandes bastonetes, cadeias curtas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio não-deformante. Gram-positivo. Com corpo para-esporal (cristal protéico).

**31a(3)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo esférico, posição terminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**31b(1)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**31b(2)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição central, esporângio deformante. Gram-positivo.

**32a(1.2)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição central, esporângio deformante. Gram-positivo.

**34a(1)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição central, esporângio deformante. Gram-positivo (esta amostra foi utilizada para extração do DNA, mas não voltou a se reproduzir para realização das provas bioquímicas).

**35a(1)** - Pequenos bastonetes, células isoladas e aos pares, endosporo não visualizado. Gram positivo (esta amostra foi utilizada para extração do DNA, mas não voltou a se reproduzir para realização das provas bioquímicas).

**35a(2)** - Pequenos bastonetes, células isoladas e longas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**35a(3)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**930(1)** - Grandes bastonetes, cadeias curtas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio não-deformante. Gram-positivo.

**930(2)** - Grandes bastonetes, cadeias curtas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio não-deformante. Gram-positivo.

**956** - Grandes bastonetes, cadeias curtas, endósporo cilíndrico, posição subterminal, esporângio não-deformante. Gram-positivo.

**1224(1)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição central, esporângio deformante. Gram-positivo.

**1224(2)** - Pequenos bastonetes, células isoladas, endósporo cilíndrico, posição terminal, esporângio deformante. Gram-positivo.

**1224(3)** - Pequenos bastonetes, células isoladas e longas, endósporo cilíndrico, posição terminal, esporângio deformante. Gram-negativo.

**Tabela 05:** Sumário dos resultados citomorfológicos das amostras isoladas.

Amostras	Esporos			Coloração
	Forma <sup>1</sup>	Posição do esporo no esporângio <sup>2</sup>	Deformação do esporângio <sup>3</sup>	Gram <sup>3</sup>
<b>30A (1)</b>	E	ST	-	+
<b>30A (2)</b>	E	T	+	+
<b>30A (3)</b>	E	L	+	+
<b>31A (1)</b>	E	C	+	+
<b>31A (2) (2.1)</b>	E	T	+	+
<b>31A (2) (2.2)</b>	E	ST	-	+
<b>31A (3)</b>	S	T	+	+
<b>31B (1)</b>	E	ST	+	+
<b>31B (2)</b>	E	C	+	+
<b>32A (1) (1.2)</b>	E	C	+	+
<b>35A (2)</b>	E	ST	+	+
<b>35A (3)</b>	E	ST	+	+
<b>930 (A)</b>	E	ST	-	+
<b>930 (B)</b>	E	ST	-	+
<b>956</b>	E	ST	-	+
<b>1224 (1)</b>	E	C	+	+
<b>1224 (2)</b>	E	T	+	+
<b>1224 (3)</b>	E	T	+	-

(1) E = Elíptico S = Esférico

(2) C = Central T = Terminal ST = Subterminal L = Lateral

(3) + = positivo

- = negativo

Quanto ao comportamento fenotípico dos isolados, os dados obtidos foram lançados na tabela 06.

**Tabela 06:** Características fenotípicas das cepas de *Bacillus* sp. isoladas.

Cepas <sup>1</sup>																		
Provas Bioquímicas e Fisiológicas <sup>2</sup>	30A (1)	30A (2)	30A (3)	31A (1)	31A (2) (2.1)	31A (2) (2.2)	31A (3)	31B (1)	31B (2)	32A (1) (1.2)	35A (2)	35A (3)	1224 (1)	1224 (2)	1224 (3)	930 (A)	930 (B)	956
ANI	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CAT	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
ANA	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
GEL	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
HEM	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
NaCl 5%	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
LEC	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
NIT	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
TIR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ACE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
VP / pH	<6	<6	<6	<6	<6	<6	>6	>6	<6	>6	>6	<6	<6	>6	>6	<6	<6	<6
GLI	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
XIL	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CAS	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
OXI	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+

(1) += positivo - = negativo

(2) ANI = Hidrólise do Amido

CAT = Catalase

CIT = Utilização do Citrato de Sódio

ANA = Crescimento Anaeróbico

GEL = Liquefação da Gelatina

HEM = Produção de Hemólise β

NaCl 5% = Crescimento em Cloreto de Sódio 5%

LEC = Lecitinase

NIT = Redução do Nitrato-Nitrito

TIR = Tirosina

ACE = Produção de Acetil-Metil Carbinol

VP/pH = pH no meio VP

GLI = Fermentação da Glicose

MAN = Fermentação da Manitol

XIL = Fermentação da Xilose

CAS = Hidrólise da Caseína

OXI = Expressão da Enzima Oxidase

Todas as estirpes analisadas apresentaram resultados negativos para: Crescimento em NaCl 7% e 10%, produção de Indol, presença de gás nas fermentações da glicose e Arabinose.

#### 4.2.1 – Espécies identificadas a partir do cultivo

Tomando por base os resultados obtidos nas análises fenotípicas, foi possível caracterizar as seguintes espécies:

**30a(1)** – *Bacillus thuringiensis*

**31a(3)** – *Bacillus sphaericus*

**30a(3)** – *Brevibacillus laterosporus*

**32a(1.2)** – *Bacillus fusiformis*

**31a(2.2)** - *Bacillus thuringiensis*

**930a** – *Bacillus cereus*



### 4.3- Análise molecular dos isolados de coprólitos.

As reações da PCR, a partir dos primers utilizados, permitiram a amplificação de diferentes segmentos significativos nas amostras, possibilitando uma possível classificação ao nível de gênero. Em alguns casos quando a amostra não aparecia no gel, a prova foi repetida pelo menos duas vezes para confirmar que não houve a amplificação.

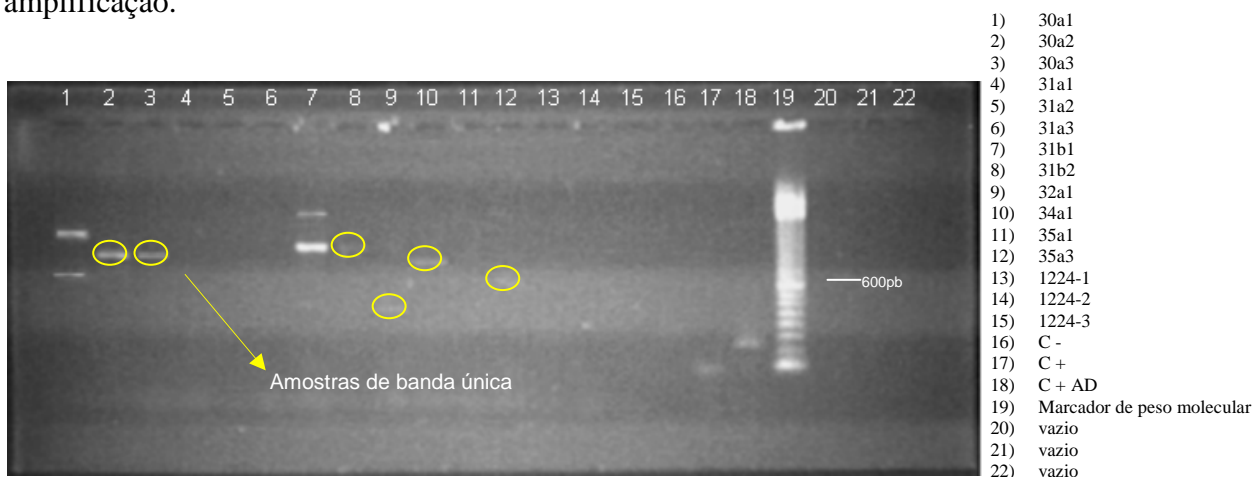


Figura 11 - Revelação do gel das amostras isoladas resultante da PCR com os primers rpoB1 e rpoB2.

As amostras que apresentaram apenas uma banda definida e única (especificadas na figura com um círculo) após a reação da PCR foram escolhidas para o sequenciamento direto do produto. Tais amostras juntamente com as outras de bandas múltiplas foram também clonadas e o produto da clonagem, seqüenciado.

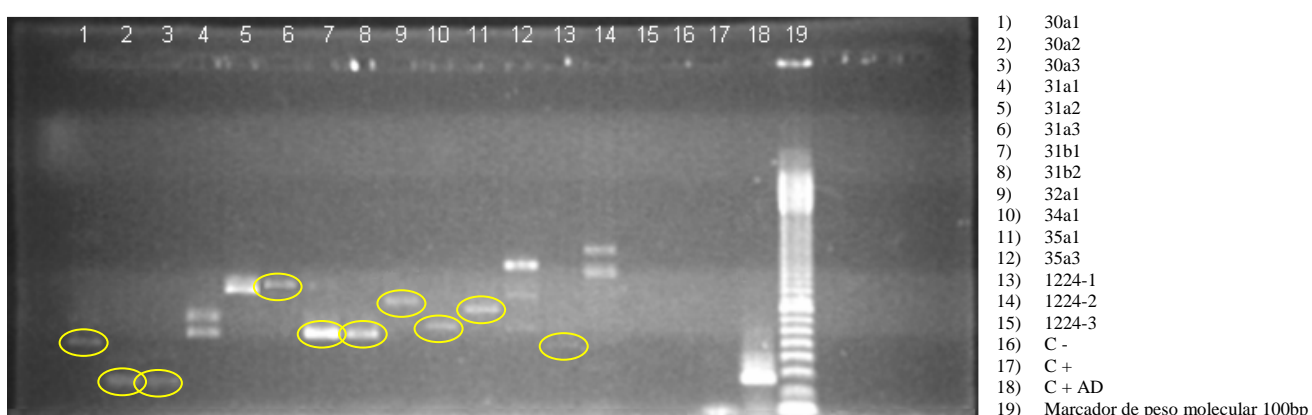


Figura 12 - Gel da PCR, das amostras isoladas, submetidas aos primers EWA-1 e EWA-2.

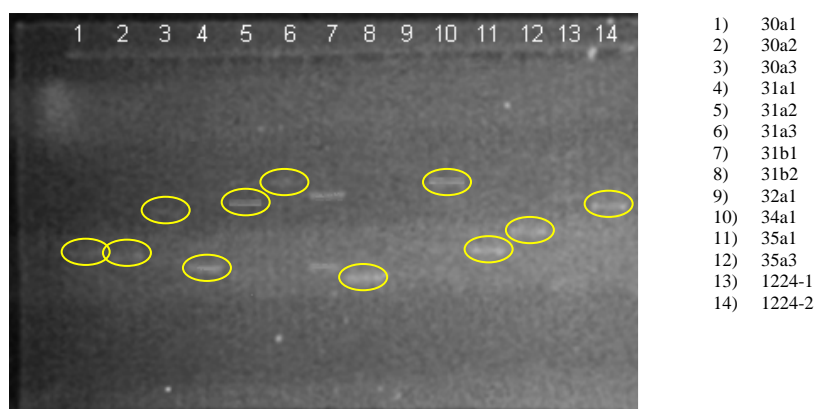


Figura 13 – Gel do comportamento das amostras com os primers GRP-1 e GRP-2.

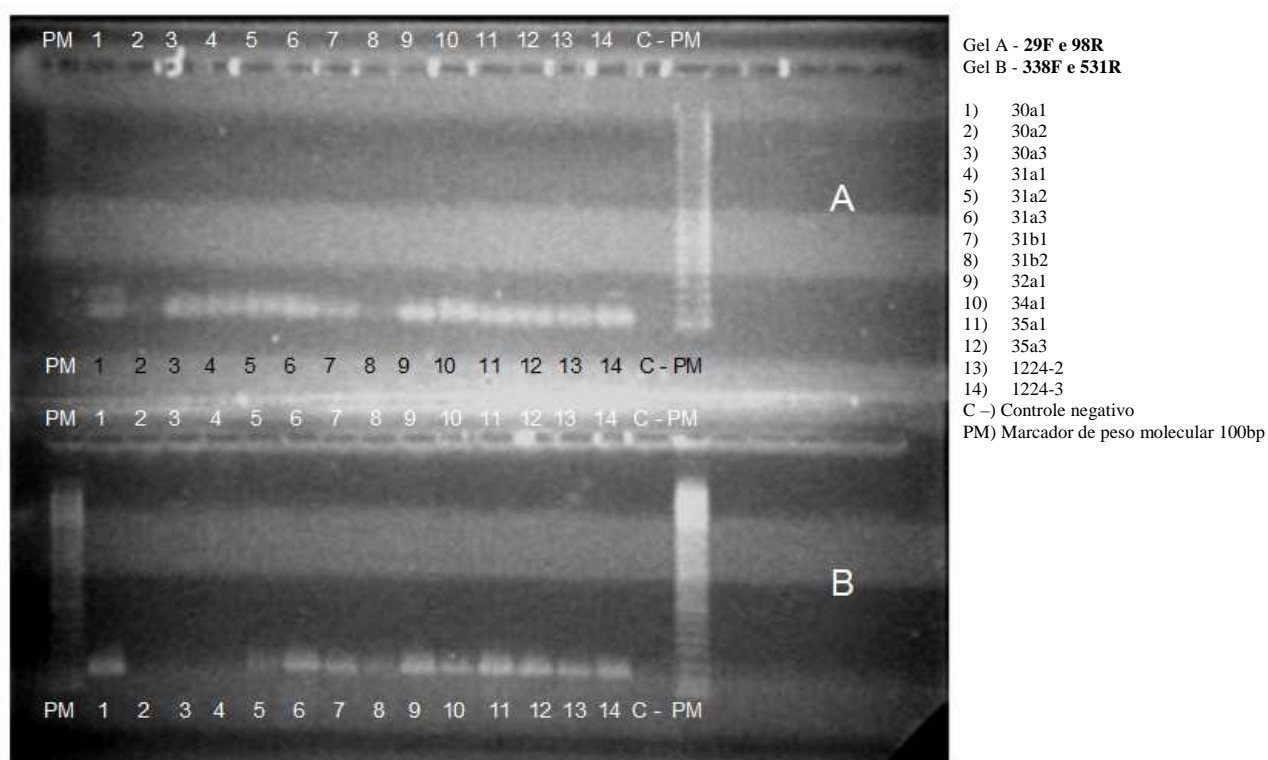


Figura 14 – Perfil das amostras submetidas aos primers universais (29F/98R e 338F/531R)

Nas amostras clonadas, após extração do plasmídeo com o inserto, avaliou-se o tamanho das bandas em gel de acordo com o peso molecular do fragmento. Aquelas que apresentaram o peso molecular menor que o padrão obtido através da extração de uma colônia sem o inserto (azul), foram consideradas inadequadas para o seqüenciamento (Figura 15).

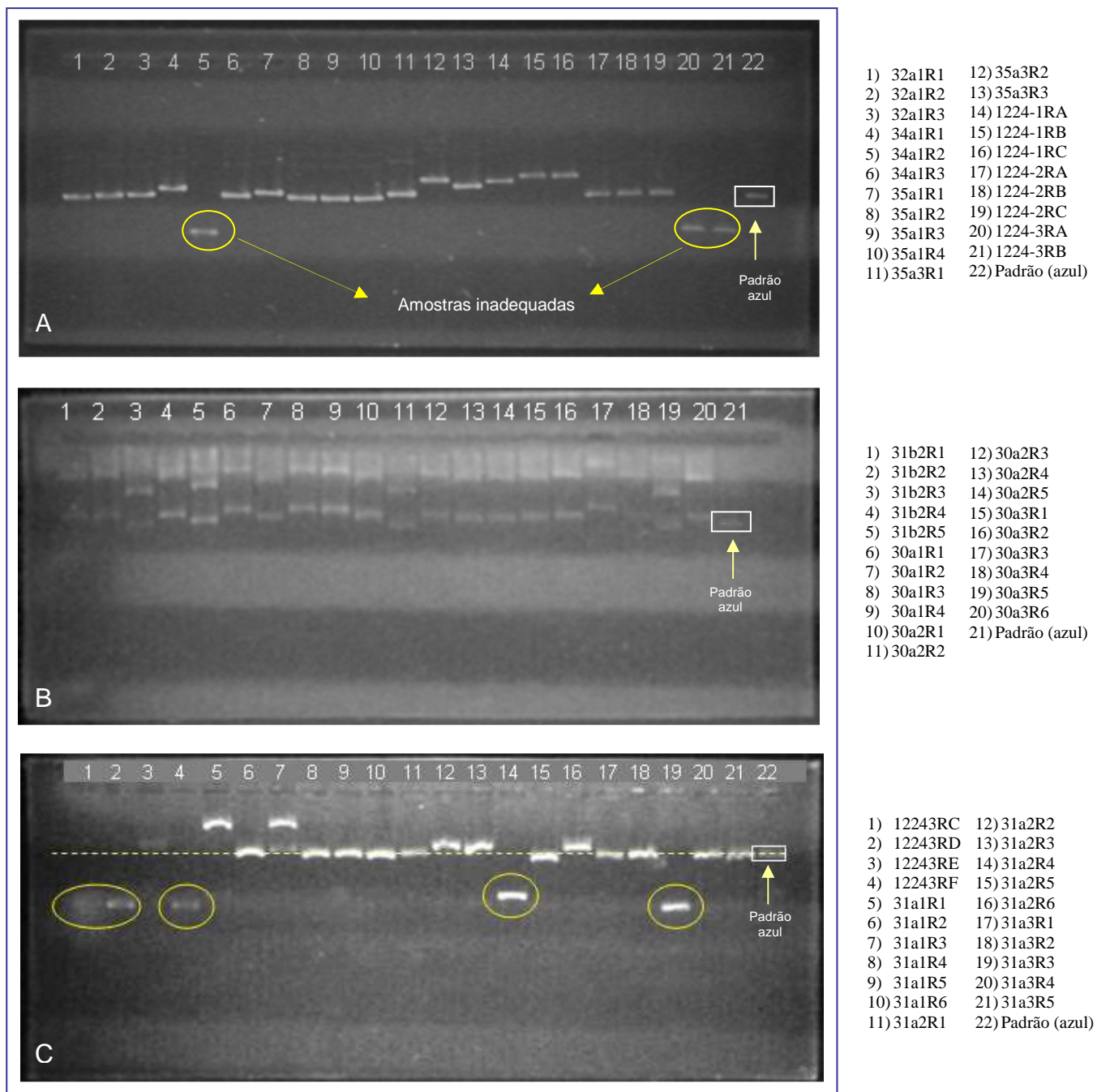
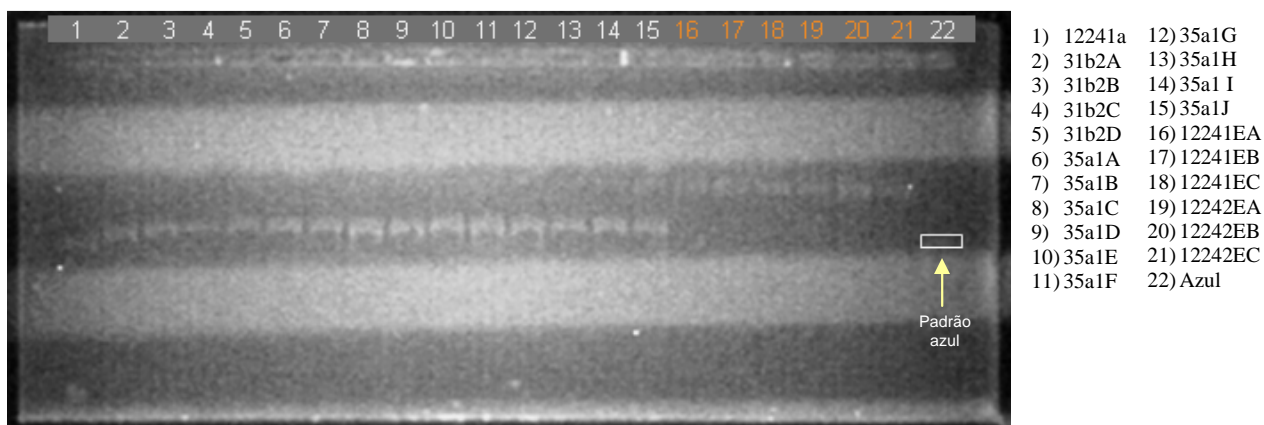


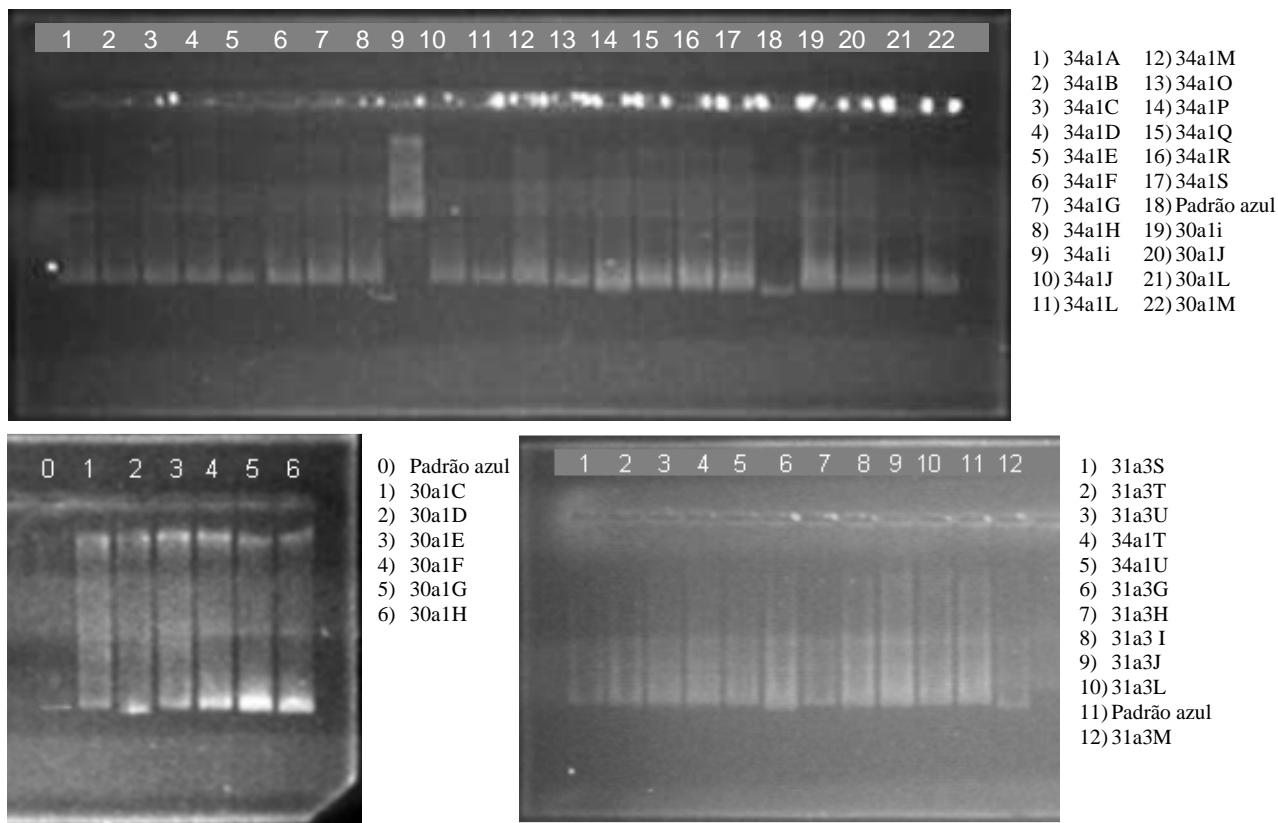
Figura 15 – Géis do material da extração e purificação dos plasmídios provenientes da reação com produtos da PCR realizada com os iniciadores *rpoB1* e *rpoB2*.



Obs- amostras 1 a 15 (mix), amostra 16 a 21 (EWA)

Figura 16 – Gel do material da extração e purificação dos plasmídios provenientes dos clones transformados com vários produtos da PCR (mix) e também com os iniciadores EWA-1 e EWA-2.

Todas as amostras clonadas provenientes da amplificação pelos primers EWA, apesar de se mostrarem com um perfil constante e definido, apresentaram bandas extremamente tênues quando submetidas à corrida eletroforética nos géis de agarose, repetindo em todas as aplicações o perfil observado na figura 16.



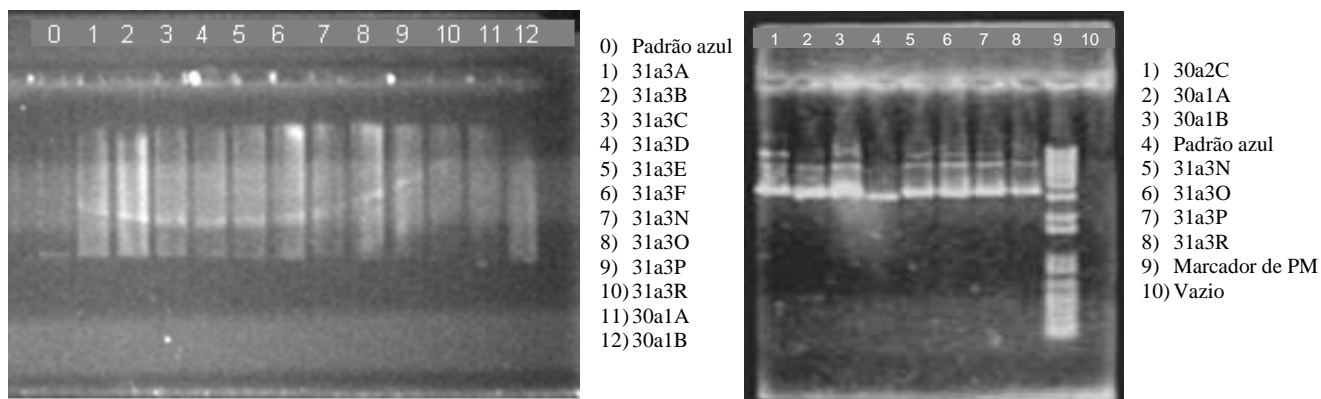


Figura 17 - Géis do material da extração e purificação dos plasmídios dos clones transformados com vários produtos da PCR (mix).

As amostras submetidas a reação de seqüenciamento diretamente do DNA purificado após as reações de PCR, não permitiram uma boa qualidade de análise das seqüências gênicas (figura 18). Todavia, aquelas seqüenciadas após a clonagem do material obtido em plasmídios e purificação do produto, possibilitaram a obtenção de diversas seqüências analisáveis cujo alinhamento e pesquisa no GenBank como explicado nos métodos, permitiu a identificação de várias seqüências bacterianas pertencentes a família Bacillaceae, principalmente do gênero *Bacillus* (Anexo 01).

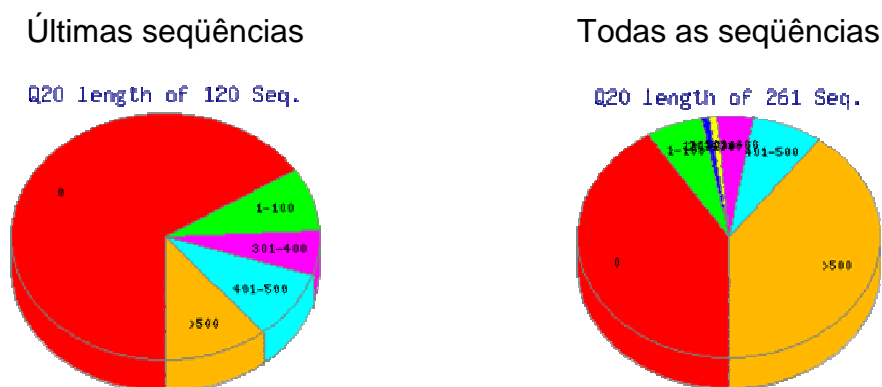


Figura 18 - Qualidade e comprimento das seqüências obtidas através da plataforma genômica (valor geral e do último seqüenciamento)

Apesar da obtenção de seqüências de qualidade, das 224 amostras clonadas submetidas a plataforma de seqüenciamento, somente um pequeno percentual obteve os atributos necessários para a análise do cromatograma e o alinhamento. Entre as que atingiram tal condição, podemos citar os vários clones das amostras 30a1, 30a2, 31a1, 31a2 e 31b2 para o rpoB; 30a2, 31b2 e 34a1 para GPR; 30a1, 30a2 para os primers universais 98R e 29F; 30a1, 31a3, 31b2, 34a1 e 35a1 para 531R e 338F.

Não houve nenhum encadeamento com qualidade satisfatória após o seqüenciamento pela plataforma genômica a partir dos isolamentos originários da amostra 32a proveniente de Unaí-MG. Assim como nas amostras 930, 956 e 1224 de São Raimundo Nonato-Piauí.

Através da análise do Blast, algumas amostras foram concordantes com a classificação bioquímica, outras apresentaram divergências inesperadas.

Com base nos iniciadores universais, não foi possível definir as espécies, considerando tratar-se de um marcador para o gênero. Todavia, a partir dos primers baseados no gene *rpoB*, a amostra 31a1, proveniente de um coprólito de Unaí/MG, classificada convencionalmente como *B.thuringiensis*, apresentou a seguinte similaridade com o clone 30a1R3:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">gij118415003 CP000485.1</a>	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	44.9	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gij49328240 AE017355.1</a>	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	44.9	44.9	28%	0.17	76%

Este percentual, apesar de pequeno demonstra proximidade com o resultado esperado, apesar da pequena seqüência obtida.

Já com o clone 30a1R4, a similaridade encontrada foi bem mais significativa:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP000485.1</a>	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	66.2	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">AE017355.1</a>	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	66.2	66.2	53%	1e-07	69%

Em contrapartida a mesma amostra (30a1) em produtos seqüenciados a partir da PCR com diferentes iniciadores, apresentou-se com E-value mais confiável, mostrando similaridade maior para outras espécies. Exemplifica-se a situação de *Bacillus firmus* com e-value de 8E-108 e score de nucleotídios coincidentes de 390 e apenas 6 nucleotídeos discordantes para o clone 30a1C (primer 338F).

Essa mesma espécie foi sugerida como mais similar nos clones 30a1A e 30a1L e 30a1R com o primer 338F e 30a1B, E, F, G, H, I, J, M, O, U, com o primer 531R com e-value 2E-88 e 325 nucleotídeos coincidentes. No entanto, nesta mesma busca através do BLAST, observamos uma similaridade idêntica para cepas de *Bacillus* sp.

Os detalhes sobre os resultados dos alinhamentos, dendogramas, bem como o percentual de similaridade e o E-value de todas as seqüências qualificadas devem ser consultados no anexo 01.

Quanto as outras amostras bioquimicamente identificadas, não houve concordância com os dados obtidos pela análise molecular, como pode ser evidenciado nos resultados lançados no anexo 01.

Para a amostra 30a2, não classificada pelos métodos fenotípicos, obtivemos várias similaridades com seqüências de *Bacillus* depositadas no Genbank. Todavia, em nenhuma houve similaridade de 100% ou próxima, obtendo-se com o par de primers 98R e 29F, 13 clones semelhantes, sugerindo com base no gene ribossomal RNA 16S, boa similaridade (E-values entre 9E-38 e 5E-35) com *Bacillus vortex* e *Bacillus tipchiralis*.

Outros clones, desta mesma amostra, resultantes da PCR com outros iniciadores originaram seqüências diferentes que obtiveram similaridade em menor percentual com *Bacillus thuringiensis* (6 clones) e *Bacillus clausii* (1 clone)

A amostra 30a3, identificada bioquimicamente como *Brevibacillus laterosporus* apresentou muito pouca identidade nos testes moleculares realizados.

Por outro lado, no comportamento do isolado 31a1, onde também não houve identificação fenotípica definida da colônia, apenas 2 clones, amplificados pelo iniciador rpob, mostraram alguma similaridade com o rRNA 16S de *B. clausii* (E-value 3E-17). Entretanto o gene em questão, por ser conservado, é detectado comumente em todos os membros da família.

No alinhamento a partir da seqüência dos clones de 31a2, cepa bioquimicamente identificada como *B.thuringiensis*, a maior identidade foi obtida também com a espécie *B. clausii* (E-value 0,078), tendo pouca similaridade com *B.subtilis* (E-value 0,29).

Nítida identidade e conformidade foi reconhecida na amostra 31a3, identificada como *Bacillus sphaericus*. Todos os 15 clones obtidos com os diferentes produtos da PCR realizada com os diferentes iniciadores apresentaram o mesmo perfil, com um E-value de 3E-106 e identidade de 385 nucleotídeos. Assim a amostra pôde ser comprovadamente confirmada com o resultado genotípico.

O isolado do coprólito 31b, após seqüenciamento, apesar de confirmar o gênero *Bacillus*, evidenciando uma identidade de 342 nucleotídeos e um E-value de 4E-93 para *Bacillus* sp., propiciou ainda vários clones que sugeriram similaridade com diversas espécies, embora não sendo possível a confirmação de nenhuma, tais como *B.halodurans*, *B. licheniformis* e *B. thuringiensis*.

Em contraposição na amostra 32a, identificada fenotipicamente como *Bacillus fusiformis* não houve nenhuma seqüência aproveitável, impossibilitando o alinhamento pelo Mega e a busca através do Blast.

Entre os vários clones obtidos da amostra bioquimicamente não caracteriada 34a, obteve-se 13 seqüências reconhecidas pela presença do par de iniciadores 338F-531R, indicando na sua maioria um e-value de 2E-110 (399 óligos coincidentes) para o gene 16S do RNA ribossomal *Lysinibacillus fusiformis* e *Lysinibacillus sphaericus* (Ahmed, *et al*<sup>159</sup>). Contudo, estas seqüências também mostraram grande similaridade com um clone de *Bacillus* sp. não cultivável (E-value 4e-111 e 401 óligos idênticos), o que denota que tais iniciadores são mais adequados para a confirmação do gênero.

Corroborando os resultados, o produto da PCR da mesma amostra, com os óligos GRP, apresentaram similaridade com *Lysinibacillus sphaericus*. Isto sugere que a amostra provavelmente se enquadra nesta espécie ou alguma outra correlata.

No que concerne a amostra 35a, somente dois dos clones obtidos possibilitaram a aquisição de seqüências de boa qualidade. Ambos, mostraram similaridade tanto para o gênero, quanto para a espécie, sendo o melhor E-value de 1E-104 com 377 nucleotídeos idênticos para *Bacillus* sp., e ambos para a espécie *Bacillus azotoformans*, com a amostra coincidindo com 352 bases análogas e um E-value de 2E-96.

Nas amostras 930, 956 e 1224 não obtivemos seqüências com qualidade para alinhamento e pesquisa pelo Blast, sendo necessárias novas tentativas de clonagens para obtenção de algum resultado.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1- Isolamento dos coprólitos

Com base nos experimentos realizados, salienta-se o isolamento de organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e correlatos, de coprólitos antigos. Um ponto de fundamental importância foi a ausência de crescimento de outras bactérias não esporuladas, o que afasta a possibilidade de uma contaminação contemporânea. Por sinal, esses achados encontram apoio nas pesquisas de Vreeland que, junto com sua equipe, conseguiu isolar *Bacillus* de amostras extremamente antigas (Vreeland *et al*<sup>160</sup>).

Os isolamentos bacterianos foram obtidos de coprólitos com idade estimada em cerca de  $3490 \pm 120$  a  $430 \pm 70$  anos, e em alguns sem datação. Em contraposição, nos espécimens mais antigos, tanto nacionais como chilenos, não se obteve êxito de isolamento de bactérias. Admite-se que tal fato ache respaldo nas condições ambientais, como a influência da aridez do local ou por algum fator associado a longevidade do esporo/composição do local de onde foi retirado.

A dificuldade de se obter um crescimento microbiano nos coprólitos chilenos foi assinalada pelo Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo (comunicação pessoal), que não conseguiu evidenciar parasitos nestes espécimens.

Os dados referentes ao êxito nos isolamentos podem ser comparados aos de Cano e Borucki<sup>126</sup> que descrevem o isolamento e a identificação de *Bacillus* viável a partir do tubo digestivo de uma abelha, com 25 a 40 milhões de anos, aprisionada em âmbar (resina de árvores fossilizadas) e encontrada na República Dominicana. Este resultado foi favorecido pela natureza e excelente preservação do material examinado. De forma similar salienta-se a investigação de Shi e colaboradores<sup>113</sup>, que cultivaram bactérias do solo da Sibéria (permafrost) em profundidades datadas de até três milhões de anos. Aproximadamente 30% dos isolados se mostraram capazes de formar endósporos. Aliás, os trabalhos realizados por Vreeland e sua equipe<sup>160</sup> endossam os achados mencionados, ao obter o isolamento de uma bactéria desconhecida, formadora de esporos, a partir de um cristal de sal de 250 milhões de anos. A análise genética demonstrou que ela tinha similaridades com linhagens de *Bacillus marismortuai* e *Virgibacillus pantothenicus*. Tais resultados servem de apoio aos nossos achados, inclusive pela presença de bactérias de gêneros idênticos ou correlatos.

Em contrapartida, o trabalho de Christner *et al*<sup>112</sup> possibilitou o isolamento de várias espécies bacterianas, inclusive Gram negativas não formadoras de esporos, tipos bacterianos não encontrados na nossa pesquisa. Provavelmente isso se deve não só ao fato da diferença do material utilizado, como também tratar-se de espécimens congeladas a ~296 metros abaixo da superfície da terra.

Outro fator interessante foi a dificuldade na identificação dos microorganismos obtidos recorrendo-se as provas bioquímicas mais comuns, nas quais foi necessário incluir outros testes menos rotineiros. Ainda assim os perfis obtidos não favoreceram uma identificação conclusiva de todos os isolados. Diante desses problemas é possível que se trate de gêneros ou espécies desconhecidas, adotando-se a mesma linha traçada por Gatson e colaboradores<sup>127</sup>, que acabaram culminando na apresentação de uma espécie ainda não descrita isolada de material antigo.

Um dado importante é que as provas ora utilizadas se concentram nas reações fenotípicas dos organismos conhecidos na atualidade, aumentando a chance de que alguns isolados pertencentes à família Bacillaceae por suas características comuns sejam, de natureza desconhecida, por seus perfis discriminatórios.

Na tentativa de minimizar o problema, foram realizados testes de biologia molecular, como a PCR com primers específicos para o gênero. Desta forma foi possível confirmar que se tratavam de microorganismos pertencentes a esta família. Entretanto, um bom número de isolados não obteve percentual significativo de homologia com as espécies catalogadas, o que reforça ainda mais a possibilidade de termos isolado espécimens ainda não catalogados.

Considerando o problema do isolamento, salienta-se como nos trabalhos de Gatson e colaboradores<sup>127</sup> a importância capital dos cuidados na esterilização através de autoclavação de todo o material utilizado nos experimentos, associado à limpeza com etanol 70° GL, de todas as câmaras de segurança biológica de classe II, utilização e troca periódica de luvas estéreis e jalecos descartáveis, bem como a esterilização das superfícies usadas com ultravioleta. Esses procedimentos foram, durante todo o tempo da manipulação do material, monitorados utilizando meios de cultura estéreis.

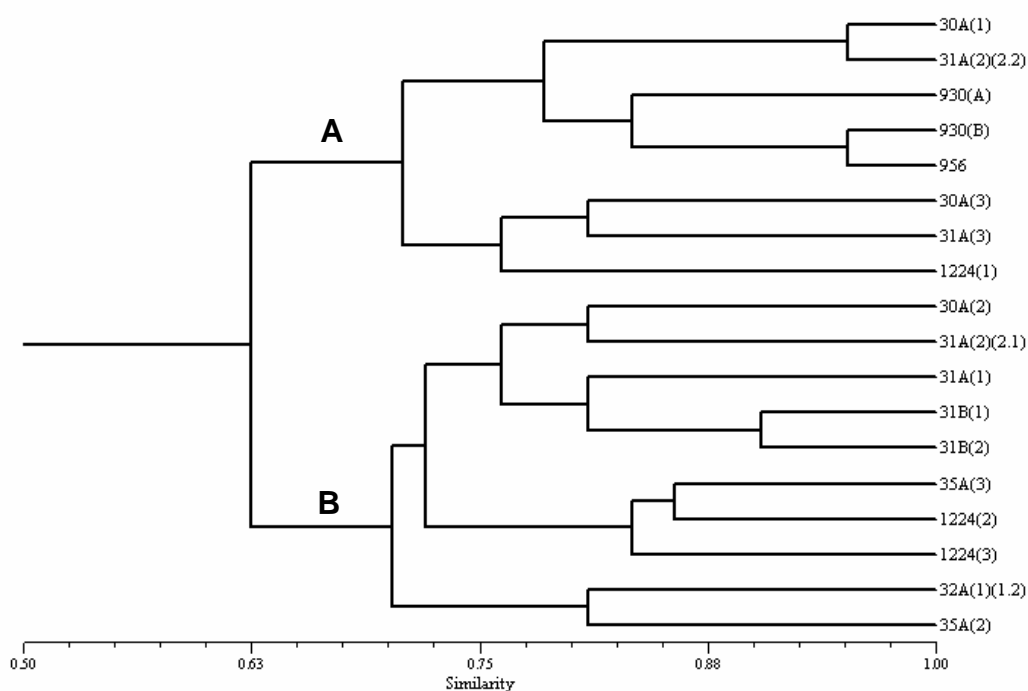
Infelizmente, não se dispunha de sedimentos e terra proveniente do local de coleta dos coprólitos para comparação, acreditamos que seria bastante interessante no momento dos estudos comparativos associados e à prevenção de possível contaminação.

Outro tópico importante a ser enfatizado está na reprodução dos experimentos em dois laboratórios distintos, com equipes distintas e protocolos concordantes, já que

houve a confirmação do isolamento proveniente dos coprólitos tanto no setor de Microbiologia do DCB-ENSP quanto no Laboratório de Fisiologia Bacteriana no IOC. As etapas iniciais de obtenção e semeadura das amostras e isolamento foram realizadas no primeiro laboratório, e ficando o segundo com execução das provas clássicas de identificação das amostras. Todos esses cuidados são apontados por Drancourt & Raoult<sup>82</sup> como critérios de autenticidade necessários aos experimentos em paleomicrobiologia.

## 6.2 – Análise Numérica

O estudo demonstrou que as estirpes de *Bacillus* sp. isoladas dos coprólitos são bioquimicamente heterogêneas, inclusive com diferentes colônias obtidas de uma mesma amostra. A análise numérica das características obtidas nos testes bioquímicos e fisiológicos revelaram 63% de similaridade entre os isolados, agrupando em dois grupos principais, A e B (Figura 19).



**Figura 19:** Dendrograma demonstrando a similaridade entre os *Bacillus* sp. isolados baseado nos dados da caracterização bioquímica, gerado usando o coeficiente de similaridade simples e o algoritmo aritmético não ponderado de agrupamento aos pares.

### 6.3 – Extração do DNA

A extração de um modo geral seguiu os cuidados recomendados por vários autores, como no caso da não utilização de controles positivos, mas empregando em contrapartida vários controles negativos (Drancourt & Raoult<sup>82</sup>).

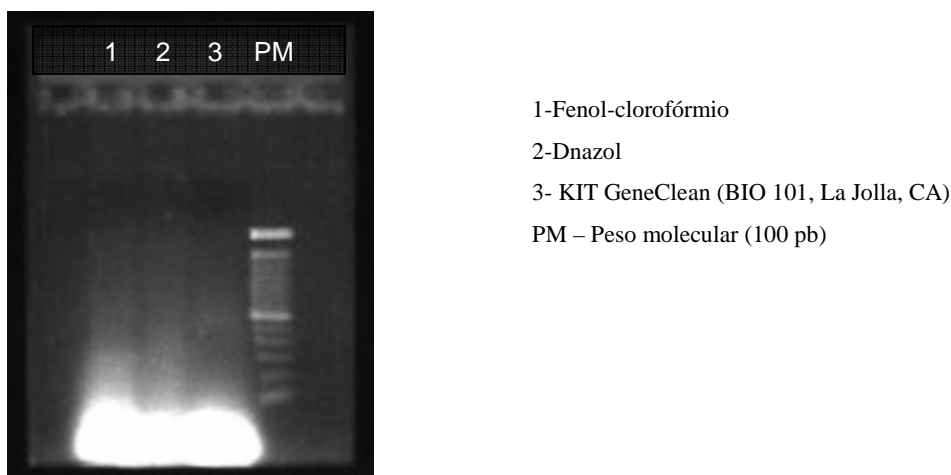


Figura 20 - Separação eletroforética em gel a 1% de agarose da extração direta do material do coprólito 1216a, negativo no isolamento bacteriano por cultivo.

A extração direta do material do coprólito, pelas diferentes técnicas, apesar de aparentemente ter sido um sucesso quando comparada com os resultados de Ubaldi e colaboradores<sup>94</sup> que obtiveram o mesmo perfil na revelação (Figura 20), não permitiram posteriores métodos de identificação ou comparação, através da PCR ou hibridação. A cor marrom obtida nestas extrações, mesmo após sucessivas lavagens e precipitações, bem como utilização de kits para purificação de DNAa, sugere a presença de diferentes inibidores destas reações. Acredita-se que algum impediante tenha dificultado as reações subsequentes.

Esses resultados são contrários aos de Iñiguez e colaboradores<sup>92</sup> que obtiveram êxito ao tentar extrair material genético diretamente do coprólito por técnicas semelhantes, sugerindo no futuro novas tentativas com outros protocolos.

Sabe-se que o DNA microbiano antigo é fragmentado ~ 300 pb e há inversa relação entre a positividade e o tamanho do alvo (Drancourt *et al*<sup>95</sup>), razão pela qual tentamos diferentes alvos moleculares nas reações da PCR.

A dificuldade de obtenção de resultados na amplificação pela PCR destes aDNAs extraídos diretamente do coprólito, levou-nos a tentar os protocolos da PCR reconstrutiva sugeridos por Iñiguez e colaboradores<sup>92</sup>, não utilizando primers, mas permitindo que a Taq polymerase e a T4 ligase realizasse a reposição de nucleotídeos nos locais, possivelmente, degradados. Infelizmente, mesmo utilizando a técnica que permitiu a essa pesquisadora eficiência na recuperação do aDNA (Iñiguez<sup>161</sup>), não foi possível obter resultados significativos ao realizar novas reações da PCR do DNA extraído diretamente do coprólito.

Apesar dos problemas de degradação, possíveis inibidores, modificações químicas e pouca quantidade de DNA (nanogramas), autores como Drancourt & Raoult<sup>82</sup>, apontam para uma série de condições positivas para preservação desse material, como a baixa temperatura, DNA de bactérias com parede celular de ácido micólico, ambientes secos e o DNA encapsulado em esporos bacterianos. Na verdade, apenas as duas últimas, possibilidades foram aplicáveis em nossos estudos.

Quanto à extração a partir do material isolado não houve dificuldade com nenhum dos métodos utilizados, todos apresentando excelente eficiência na obtenção do DNA, recuperado de bactérias viáveis e não mais tendo características consideradas de aDNA. Apontamos, sobretudo, para a eficiência do método do DNAzol (Chomczynski *et al*<sup>147</sup>), que é de extrema rapidez, estável e de fácil execução.

#### **6.4 – Reação com os primers 16S**

A amplificação com os primers universais, sugeridos por Ubaldi e colaboradores<sup>94</sup>, permitiu obter o maior número de seqüências analisáveis que se repetiram em amostras do mesmo isolado (anexo 01). Desta forma é evidente que estes primers não só auxiliaram o estudo, mas que podem ainda servir como marcadores do gênero e de qualidade dos experimentos realizados.

#### **6.5 - Reação com os primers derivados do gene rpoB:**

O gene *rpoB* que codifica a  $\beta$ -subunidade da RNA polimerase, tem servido como uma seqüência de identificação bacteriana, bem como um lócus de análise filogenética. Além disso, o *rpoB* é um gene altamente conservado, e pelo menos um exemplar está presente em todas as bactérias, devido ao seu essencial papel no metabolismo celular (Qi *et al*<sup>151</sup>; Mollet *et al*<sup>162</sup>). Segundo Blackwood *et al*<sup>163</sup>, o *rpoB*

como alvo é melhor alternativa, para discriminação mesmo entre espécies bastante conservadas, como no caso de *B.cereus* e *B.anthraxis*.

*Bacillus anthracis*, o agente etiológico do carbúnculo hemático (antraz), foi classificado taxonomicamente no grupo do *B. cereus*, incluindo também espécies estreitamente relacionadas, como *B. thuringiensis* e *B. mycoides*. Embora a manifestação patogênica e ecológica possa ser diferente entre os membros do grupo *B. cereus*, o *B. anthracis* tem um forte grau de semelhança com a seqüência DNA das espécies relacionadas. Além disso, estas espécies são indistinguíveis pela análise do RNA ribossômico, que é amplamente utilizada para estudos taxonômicos. Por estas razões, foi proposto que os membros do grupo *B. cereus* estejam envolvidos a partir de um ancestral comum (Qi *et al*<sup>151</sup>).

Nas reações de baixa estringência, admite-se, segundo Qi e colaboradores<sup>151</sup> a produção de amplicons com um tamanho de 819 pb. Com base nesses dados verificamos em nossa análise da PCR, a produção de amplicons com grande variação entre os isolados (figura 11), sugerindo a presença de estirpes diferentes.

Convém ressaltar que Qi *et al*<sup>151</sup> indicaram as seqüências dos primers *rpoB1* (5'-CGTGTTATCGTTTCCCAGC-3') e *rpoB2* (5'-AAGATGATCGATATCATCTG-3'), que foram utilizadas no presente ensaio. Estas seqüências foram derivadas de duas regiões conservadas e correspondem aos nucleotídeos 1482 a 1500 e 2281 a 2300 do gene *rpoB* de *Bacillus subtilis* (GenBank acesso nºL24376). É interessante que no GenBank, descobrimos uma falha nestes iniciadores, uma vez que os nucleotídeos 2281 a 2300 deste gene apresentam uma seqüência distinta daquela publicada no artigo: CAGATGATATCGATCATCTT. O gene *rpoB* inteiro se encontra disponível no anexo 02.

Como empregamos uma PCR com baixa estringência, mesmo a seqüência não tendo sido exatamente complementar aos iniciadores, foi possível encontrar similaridade e com isso amplificar várias porções do DNA, como pode ser evidenciado no anexo 01.

Outra estratégia utilizada foi o estudo do DNA repetitivo, que está presente nas células eucarióticas, mas também identificado em microorganismos procarióticos. Várias cópias da mesma seqüência são observadas em todo o genoma e são classificados em duas grandes categorias: a repetição de uma curta seqüência (SSRs) e a

repetição intercalada. Em ambas podemos notar mais mutações rápidas e diversificadas do que outras regiões genômicas, as abordagens baseadas nessas repetições podem fornecer informações funcionais e evolutivas das relações genéticas em espécies microbianas. Alguns tipos de SSRs representando um único locus e mostrando o número de unidades seqüenciais são chamados “variable number of tandem repeats” (VNTR) loci. Os VNTR são constituídos de 9 a 100 pares de bases repetidos seqüencialmente em loci cromossômicos e recentemente foram encontrados no gene *vrrA* de *Bacillus anthracis*. O gene codifica uma suposta glutamina de 30 kDa, rica em proteínas, que inclui cinco polimorfismos diferenciáveis pelo número de cópias de 12 pb tandem repeat o que facilitaria a diferenciação do *B. anthracis* de espécies estreitamente relacionadas ou a identificação entre isolados (Kim *et al*<sup>149</sup>).

As repetições intercaladas VNTRs são maiores do que parecem e são uniformemente dispersas em torno do cromossomo. Atualmente, existem três grupos, bem estabelecidos em numerosas espécies bacterianas. Duas repetições denominadas de seqüências intergênicas enterobacterianas consensualmente repetitivas e seqüências extragênicas palindrômicas repetitivas, foram encontradas em diferentes membros das *Enterobacteriaceae* (Kim *et al*<sup>149</sup>).

Os marcadores VNTR são analisados por meio da técnica RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), a qual é baseada em mutações que alteram seqüências no DNA de um indivíduo, de modo que enzimas de restrição podem perder a capacidade de clivar aquele DNA em posições ainda susceptíveis à clivagem nos DNAs de outros indivíduos. Assim, indivíduos podem ser diferenciados pelo comprimento de seqüências VNTR do DNA gerados após a ação de uma enzima de restrição. O padrão de fragmentos é característico e herdado por indivíduos geneticamente relacionados, uma vez que a localização dos sítios de restrição é típica.

Como desvantagem, a tipagem de alelos VNTR requer DNA íntegro e em abundância (100-500 ng), tornando praticamente inexecutável a tipagem de amostras biológicas antigas, degradadas ou com pouca quantidade de DNA. Devido a isso, na atualidade, a metodologia é raramente utilizada em investigações genéticas (Góes<sup>164</sup>) e, portanto não aplicável de forma direta em nosso estudo. Por outro lado, como são seqüências presentes na maioria dos organismos, podem servir como ponto de partida para ampliações aleatórias, quando não se sabe exatamente o que encontrar na amostra. Por esse motivo, escolhemos também esses alvos na nossa pesquisa.

A análise de diferentes alvos moleculares e o seqüenciamento dos amplicons gerados, realizados neste estudo, corroboram com as sugestões de Drancourt & Raoult<sup>82</sup> para a realização de um trabalho cuidadoso, reforçando a credibilidade dos dados encontrados.

#### 6.6- Clonagem

A *Escherichia coli* é uma bactéria haplóide contendo um único cromossomo circular ligado à membrana plasmática. Essa molécula de DNA mede cerca de 1,36 mm que é uma centena de vezes maior que o diâmetro da bactéria, razão pelo qual se apresenta sob uma forma compacta.

Os plasmídios presentes naturalmente em bactérias podem ser usados para carregar genes clonados. Para purificar o plasmídio de uma bactéria é necessário inicialmente, separá-lo do cromossomo bacteriano. Assim, o protocolo de lise alcalina inicial, utilizado nesta pesquisa permitiu essa separação já que o cromossomo bacteriano está significativamente mais associado a proteínas que vão precipitar com o sal potássico do SDS. Todavia esse protocolo funcional foi alterado, por questões de tempo e facilidade de execução, para o Kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep, projetado para isolar DNA plasmídial de alta qualidade (até 30 µg) de células de *E. coli* em 30-45 minutos pelo mesmo tipo de metodologia anterior. Todavia permite uma purificação maior do material pela passagem em coluna de sílica, permitindo a obtenção de um DNA mais puro.

No caso da avaliação da corrida eletroforética dos plasmídios no gel para definição das amostras que iriam ser seqüenciadas, deve-se considerar que a apresentação do DNA *in vivo* consiste de uma forma muito espiralada, denominada de forma I (“supercoil”) que migra rapidamente no gel. As quebras mecânicas inevitáveis na manipulação determinam que o DNA dos plasmídios se dissocie, gerando a forma II, que migra lentamente no gel. Uma terceira forma, que dá a informação exata do tamanho molecular do plasmídio, a forma III, só pode ser obtida por linearização do mesmo com uma enzima de restrição que corta o DNA num ponto específico. Todavia, a migração da forma III pode ser calculada entre a das formas I e II, aproximação usada em nosso trabalho.

Ainda considerando esta aproximação, todos os resultados das clonagens que haviam aparecido no gel abaixo do valor do padrão azul (vetor plasmídial religado sem



inserto), foram testadas e realmente na etapa do seqüenciamento apareceram sem amplificação de fragmentos, confirmando, portanto a suspeita de deleção em parte do próprio plasmídeo, ao invés de uma inserção através da transformação.

A partir da análise manual das seqüências e definição dos primers alinhados foi possível retirar do encadeamento dos nucleotídeos aqueles correspondentes ao vetor, resultando somente a seqüência a ser analisada. Em nenhum momento conseguimos evidenciar a presença dos óligos EWA1 e EWA2, apesar do material ter sido evidenciado no gel de agarose, a banda do plasmídeo que geralmente aparece na forma circular fechada “supercoil” (enrolada) não define categoricamente a presença do inserto ou seu tamanho. Somente podemos definir a ausência quando a deleção é muito grande e a migração no gel ultrapassa a do padrão utilizado (colônia azul), por esse motivo não se deve utilizar as amostras que se apresentaram abaixo deste marcador no gel (ex. Figura 15).

Quanto aos resultados dos alinhamentos, já comentados nos resultados, percebe-se que a utilização do maior número de marcadores facilita a compreensão e a análise da identidade do microorganismo. Diante desta premissa, mesmo com a utilização de vários iniciadores sugeridos por vários artigos (Jackson *et al*<sup>165</sup>, Ubaldi *et al*<sup>94</sup>, Patra *et al*<sup>166</sup> 1998, Qi *et al*<sup>151</sup>, Kim *et al*<sup>149</sup>), em muitos casos não foi possível definir a espécie do microorganismo isolado.

Esse fato corrobora novamente os estudos de Gatson e colaboradores<sup>127</sup> reforçando a certeza do isolamento de membros da família Bacillaceae ainda não descritos neste material antigo.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo, diferente de todos os outros realizados antes dele, permitiu, por meio da padronização de métodos simples de cultivo em aerobiose, com meios de cultura ricos, sólidos e líquidos, o isolamento de várias colônias bacterianas Gram positivas a partir de esporos presentes em coprólitos com datação entre  $3490 \pm 120$  a  $430 \pm 70$  anos, período pré-colombiano, correspondente à ocupação destes locais por indivíduos agricultores-ceramistas.

Com base no banco de dados criado foi possível a escolha do material mais adequado para o trabalho de acordo com o sítios, datações e volume do coprólitos. Sendo que dos três locais escolhidos para a pesquisa, apenas não houve isolamento bacteriano dos coprólitos provenientes de Atacama – Chile, por sinal, material considerado negativo em todos os estudos anteriores.

Para se ter certeza da validade deste tipo de trabalho regras rígidas de biossegurança e higiene devem ser empregadas, bem como a utilização de contra-provas, controles negativos e duplicação dos experimentos em diferentes lugares.

Foi possível, com base nestas metodologias, obter das 14 amostras utilizadas no trabalho, nove com isolamento positivo, gerando 20 colônias bacterianas para a análise, sendo que duas se tornaram inviáveis ao cultivo posterior mas puderam ser utilizadas, a partir do material criopreservado, para análise molecular.

Destas 18 mantidas e reisoladas, todas foram enquadradas na família *Bacillaceae*, mas se mostraram de difícil tipagem pelos métodos bioquímicos e moleculares empregados, sugerindo se tratar em alguns casos de cepas ainda não catalogadas: algumas que diferem em parte das que circulam atualmente e outras que possuem pouca homologia com as atuais.

A importância de se conjugar os vários métodos de identificação, convencionais e moleculares, aumenta as possibilidades de êxito no momento de correlacionar os diferentes espécimens encontrados.

A análise de todos os dados possibilitou não somente concluir que as amostras isoladas se tratavam de representantes do gênero *Bacillus* ou correlatos, mas em alguns casos definir a espécie de maior homologia, demonstrando que estas metodologias conjugadas permitem este grau de definição e que será possível, no futuro, um estudo mais minucioso da microbiota antiga associada a este material.

O amadurecimento durante esta pesquisa permitiu entender as grandes possibilidades que acenam no cenário de estudo que se apresenta. Entre elas podemos

citar a possibilidade de investigar possíveis fases evolucionárias de doenças, entre vetores e reservatórios; agentes desconhecidos de epidemias do passado; potencial para auxiliar na compreensão da emergência e re-emergência de doenças infecciosas e projetar modelos preditivos destas emergências; bem como o estudo da microbiota humana e animal e de mudanças nos microorganismos a partir da utilização de agentes antimicrobianos.

## 8. PERSPECTIVAS

### Perspectivas futuras (futuro-próximo)

Podemos avaliar hoje o trabalho como um primeiro passo dentro deste novo campo, com certeza um marco inicial para muitos trabalhos que estão por vir.

- Realizar o alinhamento de todas as amostras com os genes que deram origem aos primers utilizados. Esse procedimento terá o intuito de verificar possíveis mutações e/ou deleções que possam ter ocorrido nestes espécimens.
- Definir outras possíveis provas para identificar as amostras isoladas e caso sejam realmente desconhecidas, publicar as seqüências juntamente com as provas clássicas requerendo então o registro de espécies ainda não descritas.
- Utilizar amostras de referência para pesquisar similaridades entre as regiões VNTR a partir dos primers usados como no experimento realizado por Patra *et al*<sup>166</sup>, usando também enzimas de restrição para definir melhor os grupos VNTR das amostras isoladas.
- Aperfeiçoar os atuais métodos moleculares para identificação de espécies, avaliando novos alvos genômicos
- Depositar as seqüências obtidas no GenBank.
- Ajustar o banco de dados criado a um sistema de banco de dados relacional ou semi-estruturado, oferecendo uma interface de fácil acesso em rede para o pesquisador que deseje dados gerais e específicos sobre as amostras disponíveis no laboratório. Temos a perspectiva de realizá-lo ainda este ano e posteriormente juntar ao banco a fotografia ou o desenho original dos coprólitos

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 
- <sup>1</sup> Duarte NA, Ferreira LF, Araújo AJG. Paleoepidemiologia e Paleoparasitologia. In: Medronho RA. *Epidemiologia*. São Paulo, Editora Atheneu. 2002. p. 457-463.
- <sup>2</sup> Araújo AJG, Ferreira LF. Paleoparasitology and the Antiquity of Human Host-parasite Relationships. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 89-93, 2000.
- <sup>3</sup> Araújo AJG, Reinhard K, Bastos OM, Cantarino L, Pirmez C, Iñiguez A, Vicente AC, Morel CM, Ferreira LF. Paleoparasitology: perspectives with new techniques. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 40: 371-376, 1998.
- <sup>4</sup> Pääbo S. Amplifying DNA from archaeological remains: a meeting report. *PCR Methods Appl* 1:107-110, 1991.
- <sup>5</sup> Iñiguez AM, *Análise do DNA Ancestral para o estudo de Infecções Parasitárias em populações pré-Históricas*. Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ]. 1998.
- <sup>6</sup> Hofer CB, Hofer E. Salmoneloses In: Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias. Ed. JR Coura V.II. Doenças produzidas por bactérias. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p-1333-1342, 2005.
- <sup>7</sup> Nogueira JMR, Silva LRF, Hofer E, Araújo A. Paleoparasitologia: Revisão bibliográfica e novas perspectivas para estudos microbiológicos *Revista de Patologia Tropical* 35: 87-102, 2006.
- <sup>8</sup> Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59: 410–416, 2002.
- <sup>9</sup> Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B* 272: 3–16. 2005.
- <sup>10</sup> Poulin R, Morand S. The diversity of parasites. *Q Rev Biol* 75: 277-293, 2000.
- <sup>11</sup> Bremermann HJ. Parasites at the origin of life. *J Math Biol* 16: 165-180, 1983.
- <sup>12</sup> Nasmith K. Evolution of the cell cycle. *Phil Trans R Soc Lond* 349: 271-281, 1995.

- 
- <sup>13</sup> Orgel LE. The origin of life - a review of facts and speculations *TIBS* 23: 491-495, 1998.
- <sup>14</sup> Galtier N, Tourasse N, Gouny M. A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms. *Science* 283: 220-221, 1999.
- <sup>15</sup> Cavalier-Smith T. Obcells as proto-organisms: membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the first cells, and photosynthesis. *J Mol Evol* 53: 555-595, 2001.
- <sup>16</sup> Araújo AJG, Jansen AM, Bouchet F, Reinhard K, Ferreira LF. Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 5-11, 2003.
- <sup>17</sup> David AR. Disease in Egyptian mummies: the contribution of new technologies. *Lancet* 349:1760-1763, 1997.
- <sup>18</sup> Aufderheide AC, Rodriguez-Martin C. *The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998. p. 263-264.
- <sup>19</sup> Mendonça de Souza SMF, De Carvalho DM, Lessa A. Paleoepidemiology: is there a case to answer? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. I): 21-27, 2003.
- <sup>20</sup> Ruffer MA. *Studies in paleopathology of Egypt*. R Moodie, Ed. University of Chicago Press, Nova York - Chicago, 1921.
- <sup>21</sup> Szidat L. Uber die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor-und frühgeschichtlichen Moorleichen. *Zeitsch Parasiten* 13: 265-274, 1944.
- <sup>22</sup> Pizzi T, Schenone H. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Bol Chil Parasitol* 9: 73-75, 1954.
- <sup>23</sup> Taylor EL. Parasitic helminths in mediaeval remains. *Vet Rec* 67: 216-218, 1955.
- <sup>24</sup> Fry GF. Analysis of prehistoric coprolites of Utah. *Anthropological papers* 97: 1-45, 1977.
- <sup>25</sup> Callen EO, Cameron TWM. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Sci* 8: 35-40, 1960.

- 
- <sup>26</sup> Reinhard KJ. Mummy studies and archeoparasitology. In: Cockburn A, Cockburn E, Reyman TA (eds), *Mummies Disease and Ancient Cultures*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998. p 377-380.
- <sup>27</sup> Gonçalves MLC, Araújo AJG, Ferreira LF. Paleoparasitologia no Brasil. *Ciênc. saúde coletiva* 7: 191-196, 2002.
- <sup>28</sup> Wilke PJ, Hall HJ. *Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography*. University of California, Archaeological Reserch Facility, Department of Anthropology, Berkeley. 1975.
- <sup>29</sup> Bouchet F, Guidon N, Dittmar K, Harter S, Ferreira LF, Chaves SAM, Reinhard K, Araújo AJG. Parasite remains in Archaeological Sites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl.I): 47-52, 2003.
- <sup>30</sup> Gonçalves MLC, Silva VL, Andrade CM, Reinhard K, Rocha GC, Bailly ML, Bouchet F, Ferreira LF, Araújo AJG. Amoebiasis distribution in the past: first steps using an immunoassay technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 88-91, 2004.
- <sup>31</sup> Mendonça de Souza SMF, Araújo AJG, Ferreira LF. Saúde e doença em grupos indígenas pré-históricos do Brasil: paleopatologia e paleoparasitologia. In: *Saúde e Povos Indígenas* (R.V. Santos e C.E.A. Coimbra Jr., org), Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. p. 21-42.
- <sup>32</sup> Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Tognetti A, Bevilacqua G, Segura E. Chagas' disease in a Peruvian Inca mummy. *Lancet* 339: 128-129, 1992.
- <sup>33</sup> Sianto L, Fernandes A, Lobo RL, Ferreira LF, Gonçalves MLC, Araújo AJG. Paleoparasitologia – uma nova ciência para interpretar o passado. *Ciência – Arqueologia e Sítios arqueológicos*. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/arqueologia/arq14.shtml>, 2003.
- <sup>34</sup> Nozais JP. The origin and dispersion of human parasitic disease in the Old World (Africa, Europe and Madagascar) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. I): 13-19, 2003.
- <sup>35</sup> Chame M. Terrestrial mammal faeces: a morphometric summary and description. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl I): 71-94, 2003.

- 
- <sup>36</sup> Wilke PJ, Hall HJ. *Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography*. University of California, Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, Berkeley. 1975.
- <sup>37</sup> Andrews P, Fernandez-Jalvo Y. 101 uses for fossilized faeces. *Nature* 393: 629-630, 1998.
- <sup>38</sup> Chaves SAM, Reinhard KJ. Paleopharmacology and pollen: Method and application. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. I): 207-211, 2003.
- <sup>39</sup> Jones AKG. A coprolite from 6-8 pavement. In: Hall AR, Kenward HK, Williams D, Greig JRA. *Environment and living conditions at two Anglo-Scandinavian sites*. University of York, York. 1983. p. 225-229.
- <sup>40</sup> Reinhard KJ, Confalonieri U, Ferreira LF, Herrmann B, Araújo AJG. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37: 217-239, 1988.
- <sup>41</sup> Confalonieri U, Ferreira LF, Araújo AJG, Ribeiro BM. The use of a statistical test for the identification of helminth eggs in coprolites. *Paleopath News* 62: 7-8, 1988.
- <sup>42</sup> Chame M, Ferreira LF, Araújo AJG, Confalonieri U. Experimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. *Paleopath News* 76: 7-9, 1991.
- <sup>43</sup> Guerra RMC, Gazeta GS, Amorim M, Duarte AN, Serra-Freire NM. Ecological analysis of acari recovered from coprolites from archaeological site of northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl.1): 181-190, 2003.
- <sup>44</sup> Ferreira LF, Araújo AJG, Confalonieri U. *Paleoparasitologia no Brasil*. PEC/ENSP, Rio de Janeiro, 1988. 158p.
- <sup>45</sup> Ferreira LF, Araújo AJG, Duarte, AN. Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle Pleistocene sites, Central Italy. *J Parasitol* 79: 440-442, 1993.
- <sup>46</sup> Matsui A, Kanehara M, Kanehara M. Palaeoparasitology in Japan – Discovery of toilet features. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. I): 127-136, 2003.



- 
- <sup>47</sup> Reinhard KJ. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163, 1990.
- <sup>48</sup> Araújo AJG, Reinhard KJ, Ferreira LF. The role of mummy studies in paleoparasitology. *Chungara(Arica)* 32: 111-115, 2000.
- <sup>49</sup> Gonçalves MLC, Araújo AJG, Ferreira LF. Human intestinal parasites in the past: new findings and review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl I): 103-118, 2003.
- <sup>50</sup> Lowenstein JM. Species-specific proteins in fossils. *Naturwissenschaften* 67: 343-346, 1980.
- <sup>51</sup> Lowenstein JM. Immunological reactions from fossil material. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 292: 143-149, 1981
- <sup>52</sup> Lowenstein JM. Radioimmune assay of mammoth tissue. *Acta Zool* 170: 233-235, 1985.
- <sup>53</sup> Lowenstein JM. Immunological methods for determining phylogenetic relationships. In: Broadhead, T.W. (ed.), *Molecular evolution and the fossil record: Short Courses in Paleontology* vol 1. Paleontological Society, 1988. p. 12-19.
- <sup>54</sup> Lowenstein JM, Scheuenstuhl G. Immunological methods in molecular paleontology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333: 375-380, 1991.
- <sup>55</sup> Faulkner CT, Sharon P, Johnson SS. prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated faecal material collected from Big Bone cave, Van Buren, Tennessee. *J Parasitol* 75: 461-463, 1989.
- <sup>56</sup> Allison MJ, Bergman T, Gerszten E. Further studies on faecal parasites in antiquity. *Am J Clin Pathol* 113: 605-609, 1999.
- <sup>57</sup> Gonçalves MLC, Araújo AJG, Duarte R, Silva JP, Reinhard K, Bouchet F, Ferreira LF. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 640-643, 2002

- 
- <sup>58</sup> Voller A, Bidwell DE, Bartlett ANN. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ* 53: 55-65, 1976.
- <sup>59</sup> Guhl F, Jaramillo C, Chiriboga M, Cárdenas-Arroyo F. Aislamiento y purificación de anticuerpos a partir de cuerpos momificados. *Bioantropología* 2: 6-7, 1992.
- <sup>60</sup> Brown TA, Brown KA. Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *BioEssays* 16: 719-726, 1994.
- <sup>61</sup> Herrmann, B., Hummel, S. Introduction. In: Herrmann B, Hummel S. Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. New York: Springer Verlag. p.1-12, 1994.
- <sup>62</sup> Costa LMC. Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas da biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores de coleção do Museu Nacional - UFRJ. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1998. 70 p.
- <sup>63</sup> Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715, 1993.
- <sup>64</sup> Waggoner BM. Molecular Palaeontology. In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing group, London 12: 227-232, 2002.
- <sup>65</sup> Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 28: 44-50, 2004.
- <sup>66</sup> Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro through polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987.
- <sup>67</sup> Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16: 9775-9787, 1988.
- <sup>68</sup> Pääbo S, Wilson AC. Polymerase Chain Reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387-388, 1988.
- <sup>69</sup> Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC. Ancient DNA and the polymerase Chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 246: 9709-9712, 1989.

- 
- <sup>70</sup> Pääbo S. Ancient DNA extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1939-1943, 1989.
- <sup>71</sup> Pääbo S. Amplifying ancient DNA. In: Innis, J. ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 1990. p. 159-166.
- <sup>72</sup> Willerslev E, Hansen AJ, Rønn R, Brand TB, Barnes I, Wiuf C, Gilichinsky D, Mitchell D, Cooper A. Long-term persistence of bacterial DNA. *Curr Biol* 14: R9-R10, 2004.
- <sup>73</sup> Lindahl T. Facts and Artefacts of ancient DNA. *Cell* 90: 1-3, 1997.
- <sup>74</sup> Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289: 1139, 2000.
- <sup>75</sup> Vreeland RH, Rosenzweig WD. The question of uniqueness of ancient bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 32-41, 2002.
- <sup>76</sup> Miller RL, Ikram S, Armelagos GL, Walker R, Harer WB, Schiff CJ, Bagett D, Carrigan M, Maret SM. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid, manual ParaSight-F test. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 88: 31-32, 1994.
- <sup>77</sup> Taylor GM, Rutland P, Molleson T. A sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Plasmodium* species DNA in ancient human remains. *Ancient Biomolecules* 1: 193-203, 1997.
- <sup>78</sup> Guhl F, Jaramillo C, Yockteng R, Vallejo GA, Cárdenas-Arroyo F. *Trypanosoma cruzi* DNA in Human mummies. *Lancet* 349: 1370, 1997.
- <sup>79</sup> Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide A. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Amer J Phys Anthropol* 108: 401-407, 1999.

- 
- <sup>80</sup> Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Lorentz W, Fornacieri G, Allison M. A 9000-year Record of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039, 2004.
- <sup>81</sup> Palhano Silva CS, Nogueira JMR. Novas possibilidades em estudos paleoparasitológicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (supl): 253, 2005.
- <sup>82</sup> Drancourt M, Raoult D. Palaeomicrobiology: Current issues and perspectives. *Nat Rev Microbiol* 3: 23-35, 2005.
- <sup>83</sup> Spigelman M, Lemma E. The use of Polimerase Chain Reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in ancient skeletons. *Int J Osteoarchaeology* 3: 137-143, 1993.
- <sup>84</sup> Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2091-2094, 1994.
- <sup>85</sup> Rafi A, Spigelman M, Stanford J, Lemma E, Donoghue H, Zias J. *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR. *Lancet* 343: 1360-1361, 1994.
- <sup>86</sup> Prat JG, Mendonça de Souza SMF. Prehistoric Tuberculosis in America: Adding Comments to a literature Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl 1): 151-159, 2003.
- <sup>87</sup> Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt LC, Lev-Maor G, Bra-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet* 4: 584-592, 2004.
- <sup>88</sup> Larsen CS. Bioarchaeology: The Lives and Lifestyles of Past People. *J Archaeol Res* 10: 119-166, 2002.
- <sup>89</sup> Willcox AW. Mummies and Molecules: Molecular Biology Meets Paleopathology. *Elsevier USA* 24: 57-60, 2002.

- 
- <sup>90</sup> Fricker EJ, Spigelman M, Fricker CR. The detection of *Escherichia coli* DNA in the ancient remains of Lindow Man using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 24: 351-354, 1997.
- <sup>91</sup> Santos AKCR. 1996. Diversidade de linhagens de DNA mitocondrial de Ameríndios da Amazônia: populações contemporâneas e ancestrais. Tese de Doutorado, São Paulo: Universidade de São Paulo.
- <sup>92</sup> Iñiguez AM, Araújo AJG, Ferreira LF, Vicente ACP. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl I): 63-65, 2003a.
- <sup>93</sup> Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning – a Laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
- <sup>94</sup> Ubaldi M, Luciani S, Marota I, Fornaciari G, Cano RJ, Rollo F. Sequence Analysis of Bacterial DNA in the Colon of an Andean Mummy. *Am J Phys Anthropol* 107: 285–295, 1998.
- <sup>95</sup> Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci* 95: 12637-12640, 1998.
- <sup>96</sup> Rollo F, Marota I. How microbial ancient DNA, found in association with human remains, can be interpreted. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 111-119, 1999.
- <sup>97</sup> Zink A, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular evidence of bacteremia by gastrointestinal pathogenic bacteria in an infant mummy from ancient Egypt. *Arch Pathol Lab Med* 124: 1614-1618, 2000.
- <sup>98</sup> Cano RJ, Tiefenbrunner F, Ubaldi M, Delcueto C, Luciani S, Cox T, Orkand P, Kunzel KH, Rollo F. Sequence analysis of bacterial DNA in the colon and stomach of the Tyrolean Iceman. *Am J Phys Anthropol* 112: 297-309, 2000.
- <sup>99</sup> Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo AJG, Ferreira LF, Vicente ACP. *Enterobius vermicularis*: Ancient DNA from North and South American Human Coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 67-69, 2003.

- 
- <sup>100</sup> Nickle DC, Learn GH, Rain MW, Mullins JI, Mittler JE. Curiously Modern DNA for a “250 Million-Year-Old” Bacterium. *J Mol Evol* 54: 134–137, 2002.
- <sup>101</sup> Yoder AD, Delefosse T. The Rise and Fall and Rise of Ancient DNA Studies: Ancient DNA 2002 McGraw-Hill, *Yearbook of Science and Technology* 9-14. Disponível em: <http://www.biology.duke.edu/yoderlab/pdfs/2002YoderDelefosseYrbk.pdf>
- <sup>102</sup> Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed PR, Possnert G, Pääbo S. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281: 402-406, 1998.
- <sup>103</sup> Vray B. Relationships of molecular biology with paleoparasitology. *Vesalius* 8: 45-52, 2002.
- <sup>104</sup> Fornaciari G, Marchetti A. Intact smallpox virus particles in an Italian mummy of the Sixteenth century. *Lancet* 2: 625, 1986.
- <sup>105</sup> Cano RJ, Borucki MK, Higby-Schweitzer M, Poinar HN, Poinar Jr GO, Pollard KJ. *Bacillus* DNA in Fossil Bees: an Ancient Symbiosis? *Applied and Environmental Microbiology* 60(6): 2164-2167, 1994.
- <sup>106</sup> Dube S, Spicer T, Bryz-Gornia V, Jopnes B, Dean T, Love J, Ferrer J, Esteban N, Harrington Jr. W, Glaser J. A rapid and sensitive method of identification of HTLV-II subtypes. *J Med Virol* 45: 1-9, 1995.
- <sup>107</sup> Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. The 1918 Spanish Infl uenza: Integrating history and biology. *Microbes Infect* 3: 81-87, 2001.
- <sup>108</sup> Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Fanning TG, Zheng H, Salvatore M, Perdue M.L, Swayne DE, García-Sastre A, Palese P, Taubenberger JK. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2746-2751, 2001.
- <sup>109</sup> Fornaciari G, Zavaglia K, Giusti L, Vultaggio C, Ciranni R. Human papillomavirus in a 16th century mummy. *Lancet* 362: 1160, 2003.

- 
- <sup>110</sup> Collins M. Estimating limits to survival of DNA and proteins. School of Social Science - The University of Queensland, Brisbane, Australia. Disponível em: <http://www.ansoc.uq.edu.au/index.html?page=19072&pid=19072>, 2004.
- <sup>111</sup> Cerutti N, Salomone A, Santovito A, Rabino Massa E. La “Morte Nera” nel Medioevo: aspetti eziologici, dibattiti e nuove proposte d’indagine molecolare. Disponível em: <http://www.adquintum.info/convegni/nera.html>, 2004.
- <sup>112</sup> Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Reeve JN. Bacterial recovery from ancient ice. *Environmental Microbiology* 5:433-436, 2003.
- <sup>113</sup> Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA, Friedmann EI. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbiol Ecol* 33:169–179, 1997.
- <sup>114</sup> Halvorson SO. Rapid and simultaneous sporulation, *J Appl Bact*, 20: 305-314, 1951.
- <sup>115</sup> Foster SJ, Johnstone K. 1989. The trigger mechanism of bacterial spore germination, p. 89–108. In I. Smith, R. A. Slepecky, and P. Setlow (ed.), Regulation of procaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- <sup>116</sup> Driks, A. Bacillus subtilis spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:1–20. 1999.
- <sup>117</sup> Setlow P. 1999. Bacterial spore resistance, p. 217–230. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- <sup>118</sup> Nicholson, WL, Munakata, N, Horneck G, Melosh Hj, Setlow P. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 64(3): 548–572, 2000.
- <sup>119</sup> Nicholson WL. Using thermal inactivation kinetics to calculate the probability of extreme spore longevity: implications for paleomicrobiology and lithopanspermia, *origins of Life and Evolution of the biosphere*, 33: 621-631, 2003.
- <sup>120</sup> Bergey DH, Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. 9<sup>th</sup> Edition. 559- 564. 1994.

- 
- <sup>121</sup> Young IE, Fitz-James PC. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. I. The formation of spores in *Bacillus cereus*, *J Biophysic and Biochem Cytol* 6: 467-481, 1959.
- <sup>122</sup> Young IE, Fitz-James PC. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var. *alesti*, *J Biophysic and Biochem Cytol* 6: 483-498, 1959.
- <sup>123</sup> Young IE, Fitz-James PC. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. V. The Development of Spore Refractility, *The Journal of Cell Biology* 12: 115-133. 1962.
- <sup>124</sup> Scheldeman P, Herman L, Foster S, Heyndrickx M. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk *Journal of Applied Microbiology* 101: 542–555, 2006.
- <sup>125</sup> Nilsson M, Renberg I. Viable Endospores of *Thermoactinomyces vulgaris* in Lake Sediments as Indicators of Agricultural History *Applied and Environmental Microbiology* 56(7): 2025-2028, 1990.
- <sup>126</sup> Cano RJ, Borucki MK, Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268: 1060–1064, 1995.
- <sup>127</sup> Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, Satomi M, Venkateswaran K, Hart ME. *Bacillus tequilensis* sp. Nov., isolated from 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1475-1484. 2006.
- <sup>128</sup> Bouchet F, Harter S, Le Bailly M. The State of the Art of Paleoparasitological Research in the Old World. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(suppl. I): 95-101, 2003.
- <sup>129</sup> Combes C. Paleoparasitology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl I): 1-2, 2003.
- <sup>130</sup> Nogueira JMR, Palhano Silva CS, Gonçalves MLC, Araújo A. The importance of ethical aspects in Paleoparasitological research. *Paleopathology Newsletter* 131 (suppl): 29, 2005.



- 
- <sup>131</sup> Nogueira JMR, Palhano Silva CS. Implicações éticas na Paleoparasitologia. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (suppl I): 250, 2005.
- <sup>132</sup> Nogueira JMR, Gonçalves MLC, Araújo A, Hofer E, Silva LRF. Paleobacteriologia - primeiro passo: A informatização e a análise da coleção de coprólitos da ENSP/FIOCRUZ. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39 (suppl): número 2006.
- <sup>133</sup> Souto, PRF. 1998. Coprólitos da Formação Santa Maria, Triássico da Bacia do Paraná (Dissertação de Mestrado), Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- <sup>134</sup> Campbell AM, *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: Van der Vliet, P. C., Elsevier. 1991.
- <sup>135</sup> Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.
- <sup>136</sup> Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase labeled, a new method of conjugation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 22: 1084-1091. 1974.
- <sup>137</sup> BioControl Systems, 2003 - Catalog N° 61001-96, 61001-504. pág. 33
- <sup>138</sup> Seward MRD, Cross T, Unsworth BA. Viable bacterial spores recovered from an archeological excavation *Nature*, 261,407-408. 1976.
- <sup>139</sup> Shafaat HS, Cable ML, Ikeda MK, Kirby JP, Pelletier CC, Ponce A. Towards an In-Situ Endospore Detection Instrument. In: *Proceedings of IEEE Aerospace conference*. . Big Sky, MT. 5-12 March, 660-669. 2005.
- <sup>140</sup> Gordon RE, Haynes WC, Pang CN. The Genus *Bacillus*. Agric. Handbook U. S. Department agriculture. Washington, DC. 1973.
- <sup>141</sup> Cowan ST, Steel KJ. *Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria*. London: Edition Cambridge University Press, 1974.

- 
- <sup>142</sup> Sneath PHA *et al.* (eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; p. 5-7. 1986.
- <sup>143</sup> Vasconcellos FJM, Rabinovitch L. A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in food. *J. Food Microbiol.* v.3, n. 58, p. 235-238. 1994.
- <sup>144</sup> Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. *Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.
- <sup>145</sup> Pagano M, Gauvreau K. *Princípios de Bioestatística*. Thompson. 506p. 2004.
- <sup>146</sup> Rohlf FJ. *NTSYS-PC: Numerical Taxonomy for System for the IBM PC Microcomputer*, Setauket, New York: Applied Biostatistics, Inc.; 2002.
- <sup>147</sup> Chomczynski P, Mackey K, Drews R and Wilfinger W. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* 22: 550-553, 1997.
- <sup>148</sup> Mackey K, Williams P, Seim S and Chomczynski P. 1996. The use of DNAzol for the rapid isolation of genomic DNA from whole blood. *Biomedical Products Supplement*, 13-15.
- <sup>149</sup> Kim W, Hong Y, Yoo J, Lee W, Choi C, Chung S. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters*: 207: 21-27, 2002.
- <sup>150</sup> Clermont O, Bonacorsi S. & Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Env. Microbiol.* 66(10): 4555-4558, 2000.
- <sup>151</sup> Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Rajendra Redkar J, Delvecchio VG. Utilization of the *rpoB* Gene as a Specific Chromosomal Marker for Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis* *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8): 3720-3727, 2001.

- 
- <sup>152</sup> Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol* 178: 377-384, 1996.
- <sup>153</sup> Marranzano M, Castagna A, Pitrolo S, Ursino A, Mauro L. Use of hybridization assay and direct immunoassay for detection of *Salmonella* spp. In surface waters and a comparison with conventional culture procedure. *Microbiologica: Quarterly Journal of Microbiological Sciences*, 20:278-283. 1997.
- <sup>154</sup> Messing J, Crea R, Seeburg PH. *Nucleic Acids Research*, 9(2): 309-321, 1981.
- <sup>155</sup> Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599, 2007.
- <sup>156</sup> Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic Local Alignment-Search Tool. *J Molec Biol* 215: 403-410, 1990.
- <sup>157</sup> NCBI BLAST; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; Acesso em 15/05/2007.
- <sup>158</sup> Sousa DX, Lifschitz S. A avaliação do e-value para execução do BLAST sobre bases de dados fragmentadas. *Monografias em Ciência da Computação. PUC* 17/07 15 p. 2007.
- <sup>159</sup> Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1117-1125, 2007.
- <sup>160</sup> Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407: 897-900, 2000.
- <sup>161</sup> Iñiguez, AM. *Diagnóstico molecular de Enterobius vermicularis (Lannaeus, 1758) em populações pré-históricas: Análise da região intergência do gene ribossomal 5S RNA e do gene SL 1 RNA*. Rio de Janeiro [Tese de Doutorado: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ]. 2002.

- 
- <sup>162</sup> Mollet C, Drancourt M, Raoult D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 26(5):1005-11. 1997.
- <sup>163</sup> Blackwood KS, Turenne CY, Harmsen D, and Kabani AM. Reassessment of Sequence-Based Targets for Identification of *Bacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 42(4): 1626–1630, 2004.
- <sup>164</sup> Góes ACS. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. *Revista do Biomédico* 65: 22 - 23, 2005.
- <sup>165</sup> Jackson PJ, Walthers EA, Kalif AS, Richmond KL, Adair DM, Hill KK, Kuske CR, Andersen GL, Wilson KH, Hugh-Jones M, Keim P. Characterization of the variable-number tandem repeats in vrrA from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol* 63(4): 1400-1405, 1997.
- <sup>166</sup> Patra, G., Vaissaire J, Weber-Levy M, Doujet C, Mock M. Molecular Characterization of *Bacillus* Strains Involved in Outbreaks of Anthrax in France in 1997. *J Clin Microbiol* 36 (11): 3412–3414, 1998.

ANEXO 01 – Grau de similaridade obtido pelo BLAST, alinhamento e dendrograma das seqüências obtidas de acordo com o primer encontrado:

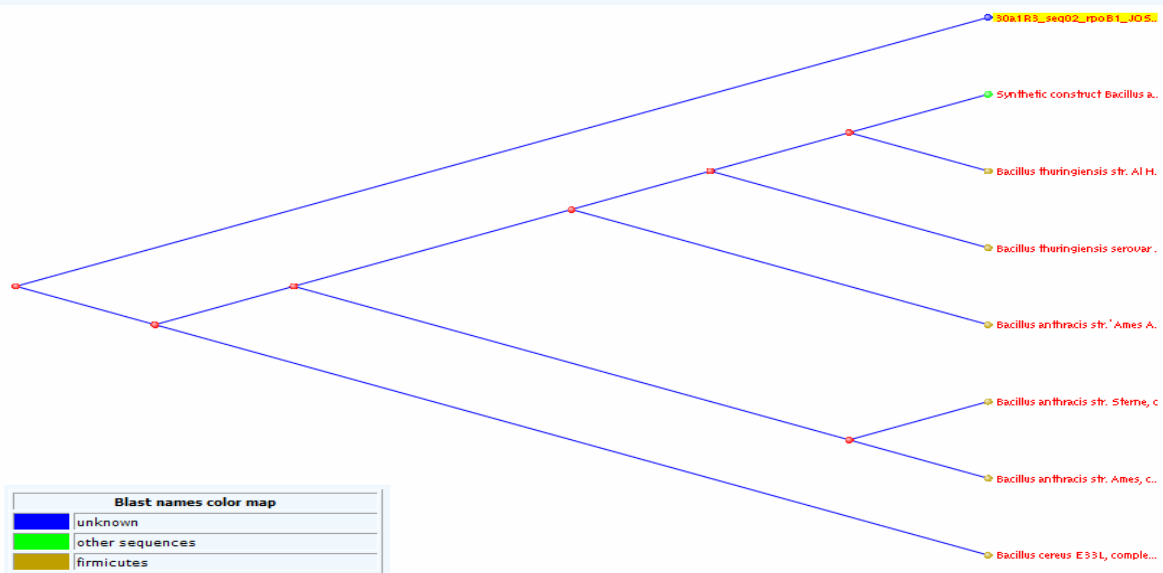
## Primer: rpoB1

**Amostra 30a1R1: sem identidade**

**Amostra 30a1R3:**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">gi118410557 EF040160.1</a>	Synthetic construct Bacillus anthracis clone FLH247530.01L BA1622 gene, complete sequence	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gi118415003 CP000485.1</a>	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gi49328240 AE017355.1</a>	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gi50082967 AE017334.2</a>	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gi49176966 AE017225.1</a>	Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gi51973633 CP000001.1</a>	Bacillus cereus E33L, complete genome	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%
<a href="#">gi30260185 AE016879.1</a>	Bacillus anthracis str. Ames, complete genome	<a href="#">44.9</a>	44.9	28%	0.17	76%

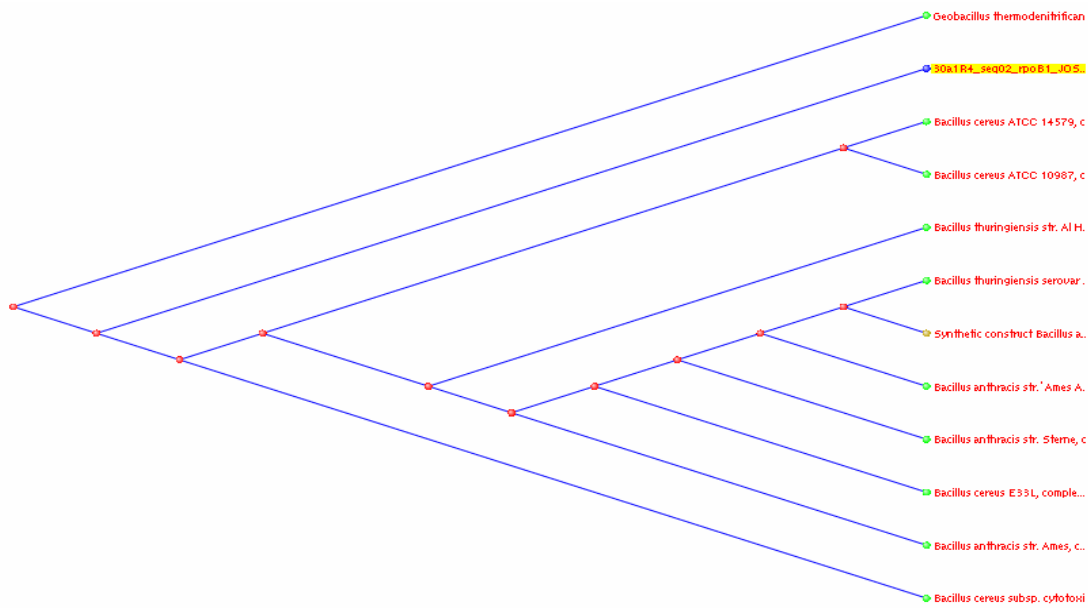
30a1R3	143	TTTGGGGATCAACTTTTGTCTTGTTCAAAATGCAATTGCTTTTTTAGAACCCCTTTTCTT	202
<a href="#">EF040160</a>	56	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	115
<a href="#">CP000485</a>	1590300	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	1590241
<a href="#">AE017355</a>	1567139	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	1567080
<a href="#">AE017334</a>	1540998	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	1540939
<a href="#">AE017225</a>	1540952	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	1540893
<a href="#">CP000001</a>	1565757	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	1565698
<a href="#">AE016879</a>	1540875	.....G.T..G.....CG.C.....T..GT....CG.T.GC..A...A...	1540816
30a1R3	203	TTAATGGTGTTCGATT	219
<a href="#">EF040160</a>	116	.....A....C...	132
<a href="#">CP000485</a>	1590240	.....A....C...	1590224
<a href="#">AE017355</a>	1567079	.....A....C...	1567063
<a href="#">AE017334</a>	1540938	.....A....C...	1540922
<a href="#">AE017225</a>	1540892	.....A....C...	1540876
<a href="#">CP000001</a>	1565697	.....A....C...	1565681
<a href="#">AE016879</a>	1540815	.....A....C...	1540799



## Amostra 30a1R4:

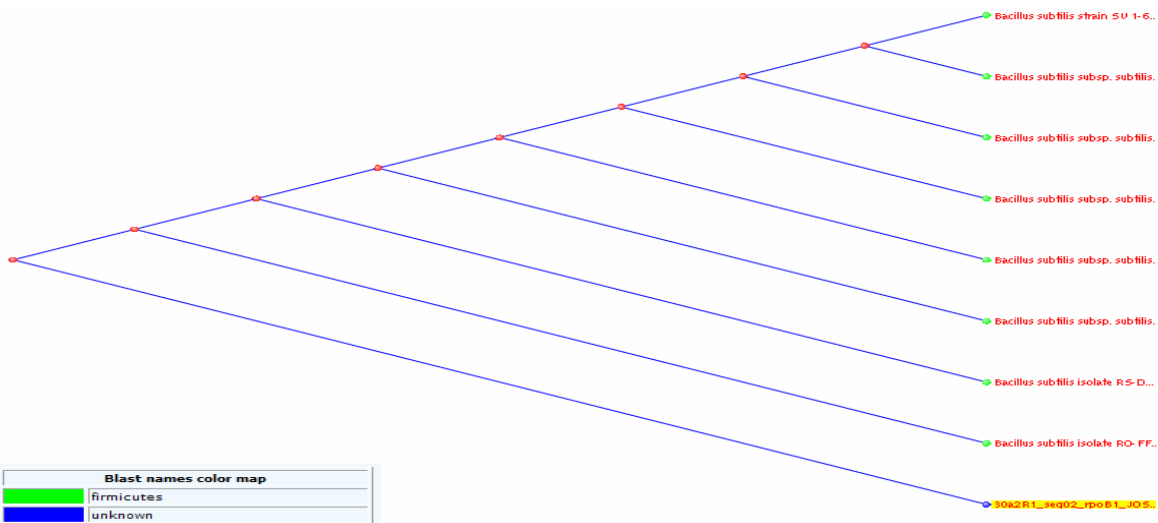
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP000485.1</a>	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">AE017355.1</a>	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">AE017334.2</a>	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">AE017225.1</a>	Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">CP000001.1</a>	Bacillus cereus E33L, complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">AE016879.1</a>	Bacillus anthracis str. Ames, complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	53%	1e-07	69%
<a href="#">AE016877.1</a>	Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome	<a href="#">64.4</a>	64.4	53%	3e-07	69%
<a href="#">AE017194.1</a>	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	<a href="#">59.0</a>	59.0	53%	1e-05	68%
<a href="#">EF040160.1</a>	Synthetic construct Bacillus anthracis clone FLH247530.01L BA1622 gene, complete sequence	<a href="#">57.2</a>	57.2	25%	5e-05	73%
<a href="#">CP000764.1</a>	Bacillus cereus subsp. cytotoxis NVH 391-98, complete genome	<a href="#">53.6</a>	53.6	20%	6e-04	77%
<a href="#">CP000557.1</a>	Geobacillus thermodenitrificans NG80-2, complete genome	<a href="#">50.0</a>	50.0	23%	0.008	71%

30a1R4	12	TTCCCGACTGAAAATAAAGCAGCTGATGAATTAGCAAGAGCTGCTATTGTA-AAAAC	70
<a href="#">CP000485</a>	1590424	...A..T.G.C.....TT.....G....T...AAA.....-..T..C...T	1590366
<a href="#">AE017355</a>	1567263	...A..T.G.C.....TT.....G....T...AAA.....-..T..C...T	1567205
<a href="#">AE017334</a>	1541122	...A..T.G.C.....TT.....G....T...AAA.....-..T..C...T	1541064
<a href="#">AE017225</a>	1541076	...A..T.G.C.....TT.....G....T...AAA.....-..T..C...T	1541018
<a href="#">CP000001</a>	1565881	...A..T.G.C.....TT.....G....T...AAA.....-..T..C...T	1565823
<a href="#">AE016879</a>	1540999	...A..T.G.C.....TT.....G....T...AAA.....-..T..C...T	1540941
<a href="#">AE016877</a>	1558511	...A..T.G.C.....T.....T...AAA.....-..T..C...T	1558453
<a href="#">AE017194</a>	1666713	...A..T.G.C.....TT.....T...AAA.....-..T..C...T	1666655
30a1R4	71	GAACAGAAAGGGAAAGAAAAATGAAAAATCTACTTTTGTTCGCTGATACGAGCTTG-CTA	129
<a href="#">CP000485</a>	1590365	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TC...TA...	1590314
<a href="#">AE017355</a>	1567204	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TT...TA...	1567153
<a href="#">AE017334</a>	1541063	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TT...TA...	1541012
<a href="#">AE017225</a>	1541017	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TT...TA...	1540966
<a href="#">CP000001</a>	1565822	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TT...TA...	1565771
<a href="#">AE016879</a>	1540940	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TT...TA...	1540889
<a href="#">AE016877</a>	1558452	T...G.---...T.T..GTG.....GAG.G.A....CC.-.TT.....	1558404
<a href="#">AE017194</a>	1666654	T...G.---...T.T..GTG-.....GA.---.G.A....CC.-.TT.....	1666606
<a href="#">EF040160</a>	37	.....A-...	42
<a href="#">CP000557</a>	1279587	.....CTT..T...-..G	1279570
30a1R4	130	TTAGTIG---CTCTCGITTTGGGGATCAACITTTTGTTCCTTGTTCAAAATGCAATIGCTTTT	186
<a href="#">CP000485</a>	1590313	..T..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	1590257
<a href="#">AE017355</a>	1567152	..C..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	1567096
<a href="#">AE017334</a>	1541011	..C..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	1540955
<a href="#">AE017225</a>	1540965	..C..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	1540909
<a href="#">CP000001</a>	1565770	..C..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	1565714
<a href="#">AE016879</a>	1540888	..C..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	1540832
<a href="#">AE016877</a>	1558403	...T...TCT..T.TA.....G.T..G....G.C.....C..T..GT...C	1558344
<a href="#">AE017194</a>	1666605	...T...TGT..T.TA.....G.T..A....CG.C.....T..GT...C	1666546
<a href="#">EF040160</a>	43	..C..CT---..T.TA.....G.T..G....CG.C.....T..GT...C	99
<a href="#">CP000764</a>	1427096	.....G.T..A....CG.....GT.A...	1427053
<a href="#">CP000557</a>	1279569	GC...C.---.GT....C.....GG.G..G..C..CG.C..C.....C...T.C...	1279513
30a1R4	187	TTAGAACCCTTTT-CITTTAATGGCGITTCGATTTCCTTAT	224
<a href="#">CP000485</a>	1590256	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	1590220
<a href="#">AE017355</a>	1567095	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	1567059
<a href="#">AE017334</a>	1540954	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	1540918
<a href="#">AE017225</a>	1540908	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	1540872
<a href="#">CP000001</a>	1565713	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	1565677
<a href="#">AE016879</a>	1540831	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	1540795
<a href="#">AE016877</a>	1558343	G.T.GT..A..A-.G.....TA...C...-....	1558307
<a href="#">AE017194</a>	1666545	G.T.GT..A..A-.A.....TA.A..C...-....	1666509
<a href="#">EF040160</a>	100	G.T.GC..A..A-.....TA...C...-....	136
<a href="#">CP000764</a>	1427052	G-...T.....A.A....C.CTA...-...T....	1427016
<a href="#">CP000557</a>	1279512	.....GC.G.-.G.....	1279493



**Amostra 30a2R1: pouca identidade**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">gi 161345222 EU137645.1</a>	Bacillus subtilis strain SV 1-6 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 16563649 EF015382.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 1A-2 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 16563577 EF015346.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A17 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 16563575 EF015345.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A16 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 16563563 EF015339.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A10 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 16563525 EF015320.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC2A10 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 18104655 AF458684.1</a>	Bacillus subtilis isolate RS-D-2 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%
<a href="#">gi 18104651 AF458682.1</a>	Bacillus subtilis isolate RO-FF-1 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	8%	0.17	100%



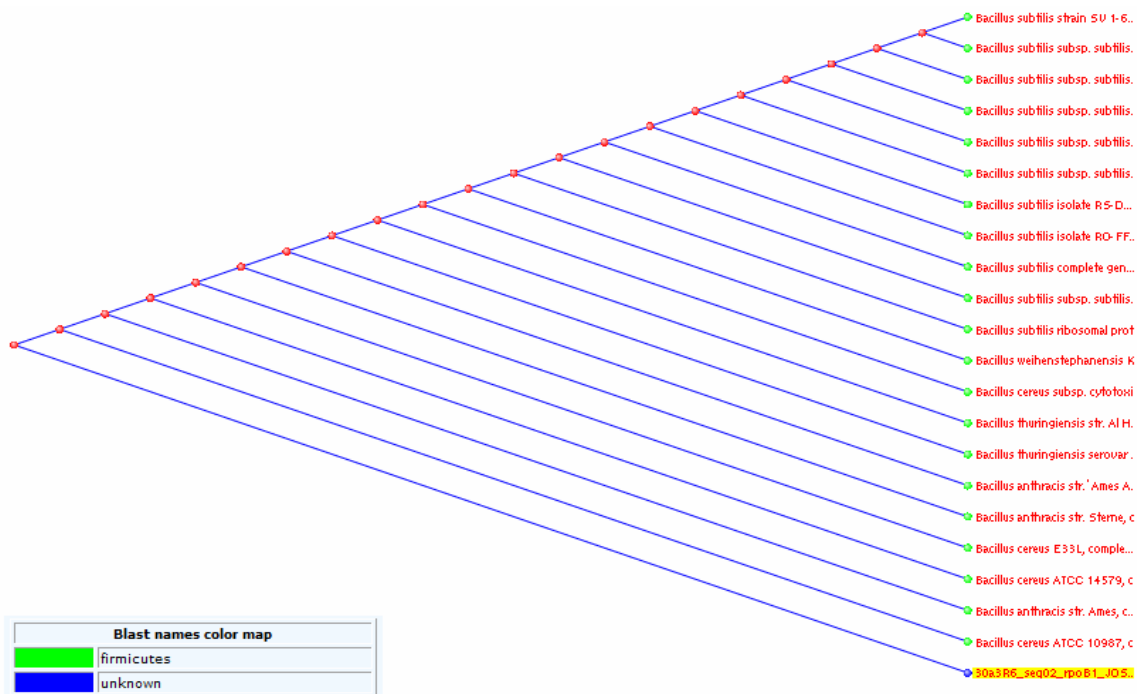
**Amostras 30a2R2, 30a2R3, 30a2R4, 30a2R5: sem identidade**  
**Amostra 30a3R4: sem identidade**

## Amostra 30a3R6: pouca identidade

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">gi 161345222 EU137645.1</a>	Bacillus subtilis strain SV 1-6 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 116563649 EF015382.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 1A-2 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 116563577 EF015346.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A17 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 116563575 EF015345.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A16 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 116563563 EF015339.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A10 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 116563525 EF015320.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC2A10 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 18104655 AF458684.1</a>	Bacillus subtilis isolate RS-D-2 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 18104651 AF458682.1</a>	Bacillus subtilis isolate RO-FF-1 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 32468687 Z99104.2</a>	Bacillus subtilis complete genome (section 1 of 21): from 1 to 213080	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 46019147 AJ586566.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis partial rpoB gene for DNA-directed RNA polymerase beta chain, strain LMG 7135	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 402360 L24376.1</a>	Bacillus subtilis ribosomal protein L7/12 (rpL) gene, beta subunit of RNA polymerase (rpoBC) gene, 3' end, complete cds, 5' end	<a href="#">37.2</a>	37.2	7%	0.21	100%
<a href="#">gi 163860210 CP000903.1</a>	Bacillus weihenstephanensis KBAB4, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 152022606 CP000764.1</a>	Bacillus cereus subsp. cytotoxis NVH 391-98, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 118415003 CP000485.1</a>	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 49328240 AE017355.1</a>	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 50082967 AE017334.2</a>	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 49176966 AE017225.1</a>	Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 51973633 CP000001.1</a>	Bacillus cereus E33L, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 29899096 AE016877.1</a>	Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome	<a href="#">35.3</a>	68.7	12%	0.79	100%
<a href="#">gi 30260185 AE016879.1</a>	Bacillus anthracis str. Ames, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%
<a href="#">gi 42740913 AE017194.1</a>	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	<a href="#">35.3</a>	35.3	6%	0.79	100%

30a3R6	1	CGIGTTATCGTTTCCCAGCGTTACTACATCCTTTGGAATGGCCGGTGCATCAAGGGTA	60
<a href="#">EU137645</a>	340	.....	358
<a href="#">EF015382</a>	330	.....	348
<a href="#">EF015346</a>	330	.....	348
<a href="#">EF015345</a>	330	.....	348
<a href="#">EF015339</a>	330	.....	348
<a href="#">EF015320</a>	330	.....	348
<a href="#">AF458684</a>	172	.....	190
<a href="#">AF458682</a>	172	.....	190
<a href="#">Z99104</a>	122309	.....	122327
<a href="#">AJ586566</a>	349	.....	367
<a href="#">L24376</a>	1482	.....	1500
<a href="#">CP000903</a>	114352	.....	114369
<a href="#">CP000764</a>	115094	.....	115111
<a href="#">CP000485</a>	114509	.....	114526
<a href="#">AE017355</a>	114516	.....	114533
<a href="#">AE017334</a>	108784	.....	108801
<a href="#">AE017225</a>	108785	.....	108802
<a href="#">CP000001</a>	108779	.....	108796
<a href="#">AE016877</a>	114301	.....	114318
<a href="#">AE016879</a>	108784	.....	108801
<a href="#">AE017194</a>	108786	.....	108803
30a3R6	61	AGATGGGCTAATTACGCTAGGAAAGGAAGCTTGCAGACATGGAGAAGAGTCACAA	116
<a href="#">AE016877</a>	2175481	.....	2175497





### Amostra 31a1R3: sem identidade

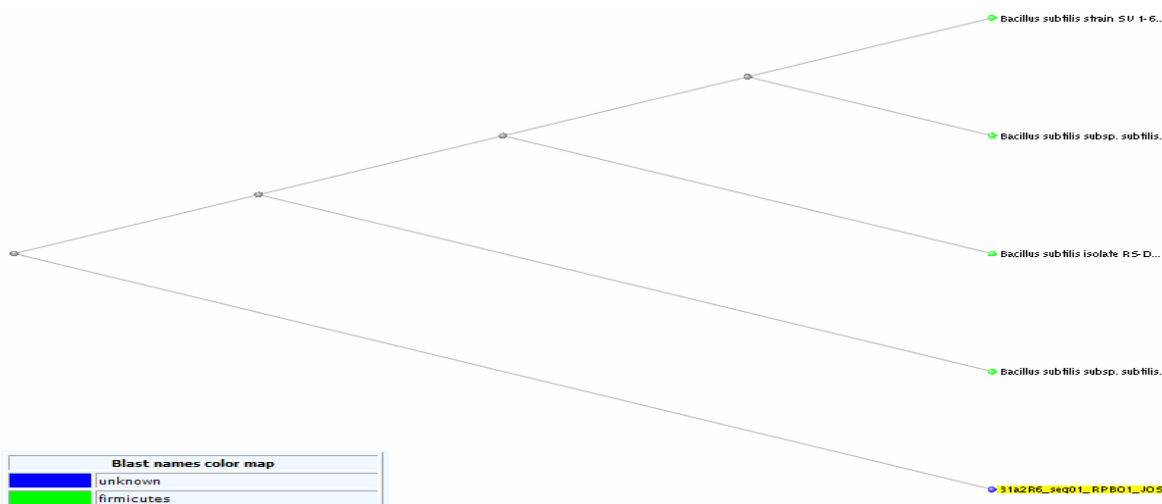
### Amostra 31a2R6:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<a href="#">gi 56908016 AP006627.1</a>	Bacillus clausii KSM-K16 DNA, complete genome	<a href="#">39.1</a>	107	17%	0.078	95%
<a href="#">gi 161345222 EU137645.1</a>	Bacillus subtilis strain SV 1-6 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 157679556 CP000813.1</a>	Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	<a href="#">37.2</a>	70.6	9%	0.29	95%
<a href="#">gi 154350369 CP000560.1</a>	Bacillus amyloliquefaciens FZB42, complete genome	<a href="#">37.2</a>	37.2	5%	0.29	92%
<a href="#">gi 116563649 EF015382.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 1A-2 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 116563577 EF015346.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A17 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 116563575 EF015345.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A16 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 116563563 EF015339.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC4A10 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 116563525 EF015320.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3EC2A10 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 18104655 AF458684.1</a>	Bacillus subtilis isolate RS-D-2 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 18104651 AF458682.1</a>	Bacillus subtilis isolate RO-FF-1 RpoB (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 32468687 Z99104.2</a>	Bacillus subtilis complete genome (section 1 of 21): from 1 to 213080	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%
<a href="#">gi 46019147 AJ586566.1</a>	Bacillus subtilis subsp. subtilis partial rpoB gene for DNA-directed RNA polymerase beta chain, strain LMG 7135	<a href="#">37.2</a>	37.2	4%	0.29	100%

```

30a2R6      1      CGTGTATCGTITCCAGC    19
EU137645   340      .....                358
EF015382   330      .....                348
EF015346   330      .....                348
EF015345   330      .....                348
EF015339   330      .....                348
EF015320   330      .....                348
AF458684   172      .....                190
AF458682   172      .....                190
Z99104     122309   .....                122327
AJ586566   349      .....                367

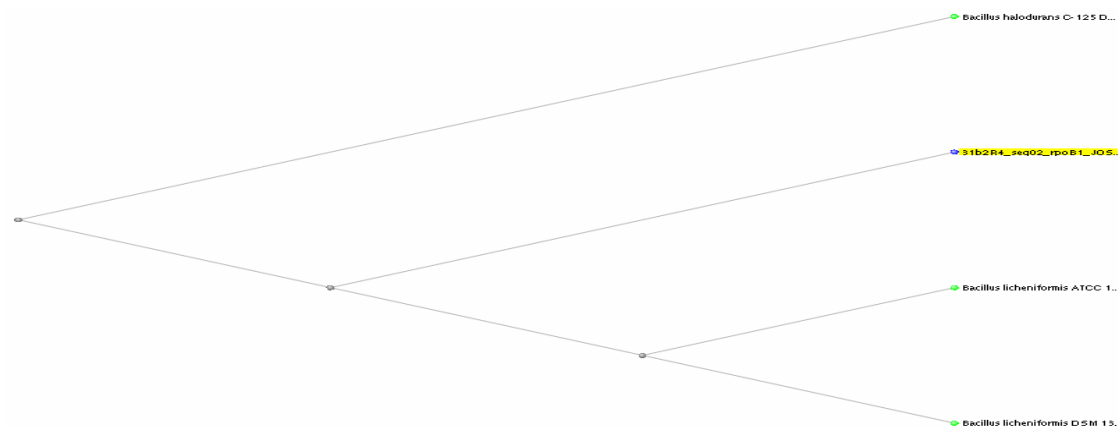
```



### Amostra 31b2R4:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">BA000004.3</a>	Bacillus halodurans C-125 DNA, complete genome	<a href="#">91.5</a>	91.5	80%	4e-15	65%
<a href="#">CP000002.3</a>	Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome	<a href="#">86.0</a>	86.0	34%	2e-13	70%
<a href="#">AE017333.1</a>	Bacillus licheniformis DSM 13, complete genome	<a href="#">86.0</a>	86.0	34%	2e-13	70%
<a href="#">CP000813.1</a>	Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	<a href="#">66.2</a>	66.2	34%	1e-07	67%
<a href="#">AP006627.1</a>	Bacillus clausii KSM-K16 DNA, complete genome	<a href="#">53.6</a>	53.6	13%	9e-04	76%

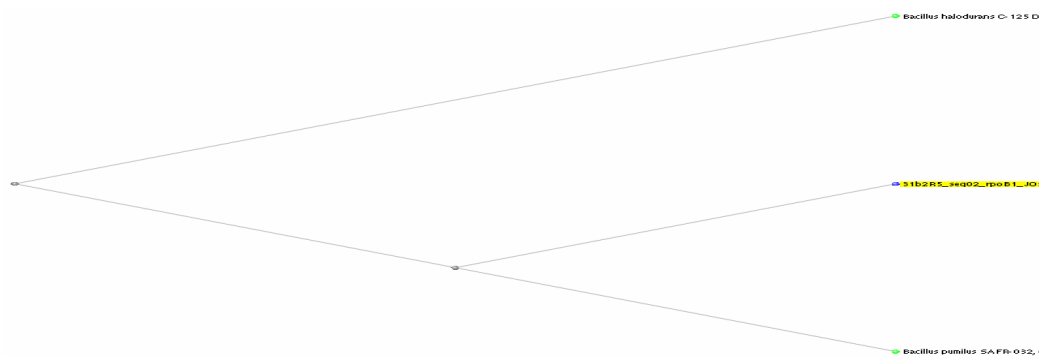
31b2R4	11	TTTCCAGCGTTTATTGCGCAITCTTTGTTGATTGTATTAAATACCAACGGTTTCTGAAAC	70
<a href="#">BA000004</a>	893803	.....GC.....C...AC..C...CG..T....C.....GG.A..GG.	893862
31b2R4	71	CTATGCAAAACGAGATATGTCGAT--GTTACAAACCTTACTACAGCAAGTGATGAAAATA	128
<a href="#">BA000004</a>	893863	...T.G..GG.T..C...--...CG.C.G...CGGC.TT..AC.A.T.....CTCGG.	893920
31b2R4	129	ACATTTATGTACGGCATCCCTGCCTGTG-TCATTTTTTATTATTTCGCAGAACCA-CTCA	186
<a href="#">BA000004</a>	893921	..G...G...T.CAG...AT.G-...C..G.G.....T.....C-...G.G..G.	893978
31b2R4	187	CTCATATTTTCTTGAATCAGCATCAGCAACCGTGTATTGCAAATGCTATGGCCTTATT	246
<a href="#">BA000004</a>	893979	.AAG.T.G..T.....G.CT..C.T..GG.T..C..C.....C.T..CGTT..A....	894038
<a href="#">CP000002</a>	1554025	.....T.G.....G....	1554042
<a href="#">AE017333</a>	1553876	.....T.G.....G....	1553893
31b2R4	247	TTTTATCCATTICTICATGATTCCAATGCAGGCTTTTCTAATIGGTCICGGITTAGTAA	306
<a href="#">BA000004</a>	894039	.C..C..T..C..T...G.C.....G....A..C...T.G..C....T..GA.GA.G.	894098
<a href="#">CP000002</a>	1554043	.....C..T..TGC...G..TT.T....C.G.T....C..AA.G..G..G.CC.	1554102
<a href="#">AE017333</a>	1553894	.....C..T..TGC...G..TT.T....C.G.T....C..AA.G..G..G.CC.	1553953
31b2R4	307	AAGATGCATTTATTCATAATATATGGTCAACTGICGICTCATTTGGAATTATGTTGCCT	366
<a href="#">BA000004</a>	894099	.G.....G...TAC...TCGG.T...G.C..A..G..T..T.AC.TGC.C...AT.TGC	894158
<a href="#">CP000002</a>	1554103	.....T...TA.....CG.T...G.C.G...T.A..G...TTG..G...AT.TTC	1554162
<a href="#">AE017333</a>	1553954	.....T...TA.....CG.T...G.C.G...T.A..G...TTG..G...AT.TTC	1554013
31b2R4	367	TAGGTTTCGATGCAAAACATTGCAAAATGGAGGGGAATCATTATTGGIATGAACATGGGAGCTG	426
<a href="#">BA000004</a>	894159	.C..A.....C.CA.C.A.....A.....C.....T.CA..T.IC.	894218
<a href="#">CP000002</a>	1554163	.C..G..C.....G..T.....G...AC...G.....C...CG.....	1554211
<a href="#">AE017333</a>	1554014	.C..G..C.....G..T.....G...AC...G.....C...CG.....	1554062
31b2R4	427	TCTTACTTGCCCTCAGCATT	447
<a href="#">BA000004</a>	894219	..A.GT.GA.G.....	894239



### Amostra 31b2R5:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP000813.1</a>	Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	<a href="#">60.8</a>	60.8	10%	4e-06	92%
<a href="#">BA000004.3</a>	Bacillus halodurans C-125 DNA, complete genome	<a href="#">51.8</a>	51.8	10%	0.002	87%

31b2R5	338	GGAGGGGATCTCTTGGAAAAAGTCGACATTTTTAAGGATAT	378
<a href="#">CP000813</a>	2059513	.....A.....T.....C.....	2059473
<a href="#">BA000004</a>	1720819	.....GA.....C..A..C..	1720859

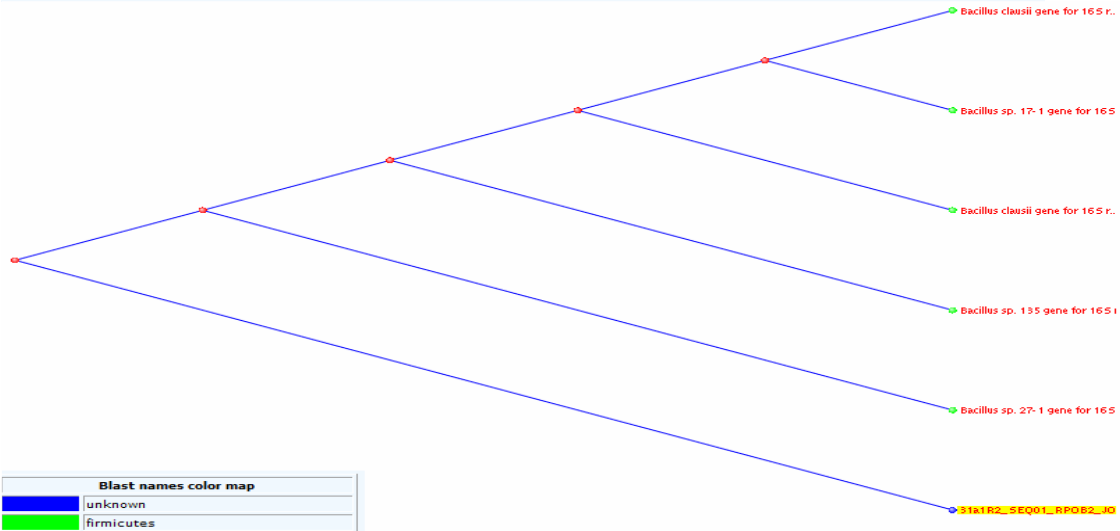


### Primer: rpoB2

### Amostras: 31a1R2, 31a1R5, 30a2R2 (\*<sup>1</sup>):

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AB201800.1</a>	Bacillus clausii gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:M-29-A	<a href="#">87.8</a>	87.8	52%	3e-17	100%
<a href="#">AB043843.1</a>	Bacillus sp. 17-1 gene for 16S rRNA	<a href="#">86.0</a>	86.0	51%	1e-16	100%
<a href="#">AB201801.1</a>	Bacillus clausii gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:M-29-B	<a href="#">80.6</a>	80.6	48%	5e-15	100%
<a href="#">AB043840.1</a>	Bacillus sp. 135 gene for 16S rRNA	<a href="#">73.4</a>	73.4	43%	7e-13	100%
<a href="#">AB043845.1</a>	Bacillus sp. 27-1 gene for 16S rRNA	<a href="#">48.2</a>	48.2	28%	3e-05	100%

*1	44	CGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTA	91
<a href="#">AB201800</a>	1515	.....	1562
<a href="#">AB043843</a>	1512	.....	1558
<a href="#">AB201801</a>	1517	.....	1560
<a href="#">AB043840</a>	1515	.....	1554
<a href="#">AB043845</a>	1516	.....	1541

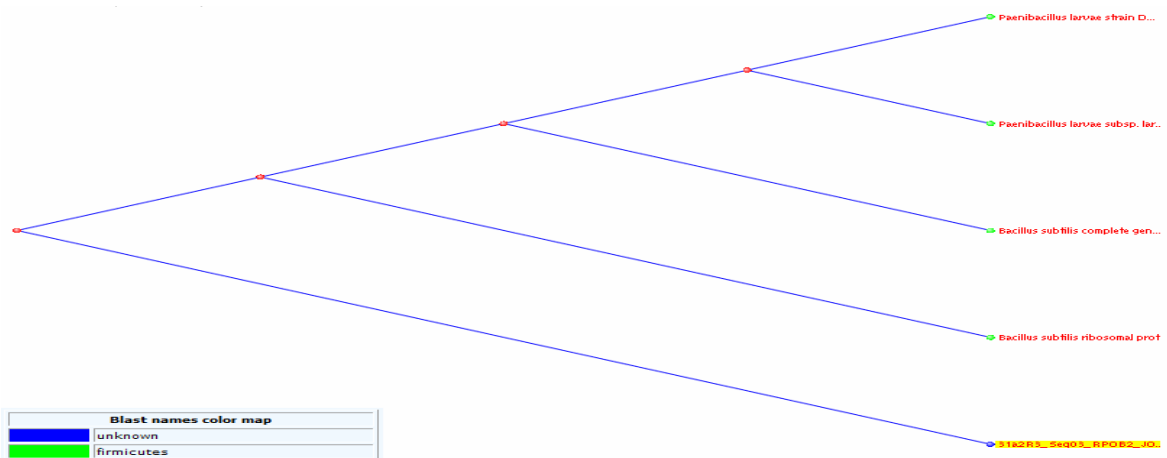


Blast names color map	
	unknown
	firmicutes

**Amostras: 31a2R3, 31a2R2 (\*<sup>2</sup>): pouca similaridade**

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
<a href="#">EF203473.1</a>	Paenibacillus larvae strain DSM 3615 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	<a href="#">37.4</a>	37.4	3%	0.78	100%	
<a href="#">EF203472.1</a>	Paenibacillus larvae subsp. larvae strain DSM 7030 RNA polymerase beta subunit-like (rpoB) gene, partial sequence	<a href="#">37.4</a>	37.4	3%	0.78	100%	
<a href="#">Z99104.2</a>	Bacillus subtilis complete genome (section 1 of 21): from 1 to 213080	<a href="#">37.4</a>	37.4	3%	0.78	100%	
<a href="#">L24376.1</a>	Bacillus subtilis ribosomal protein L7/12 (rplL) gene, beta subunit of RNA polymerase (rpoBC) gene, 3' end, complete cds, 5' end	<a href="#">37.4</a>	37.4	3%	0.78	100%	

*2	1	AAGATGATCGATATCATCTG	20
<a href="#">EF203473</a>	800	.....	781
<a href="#">EF203472</a>	801	.....	782
<a href="#">Z99104</a>	123127	.....	123108
<a href="#">L24376</a>	2300	.....	2281

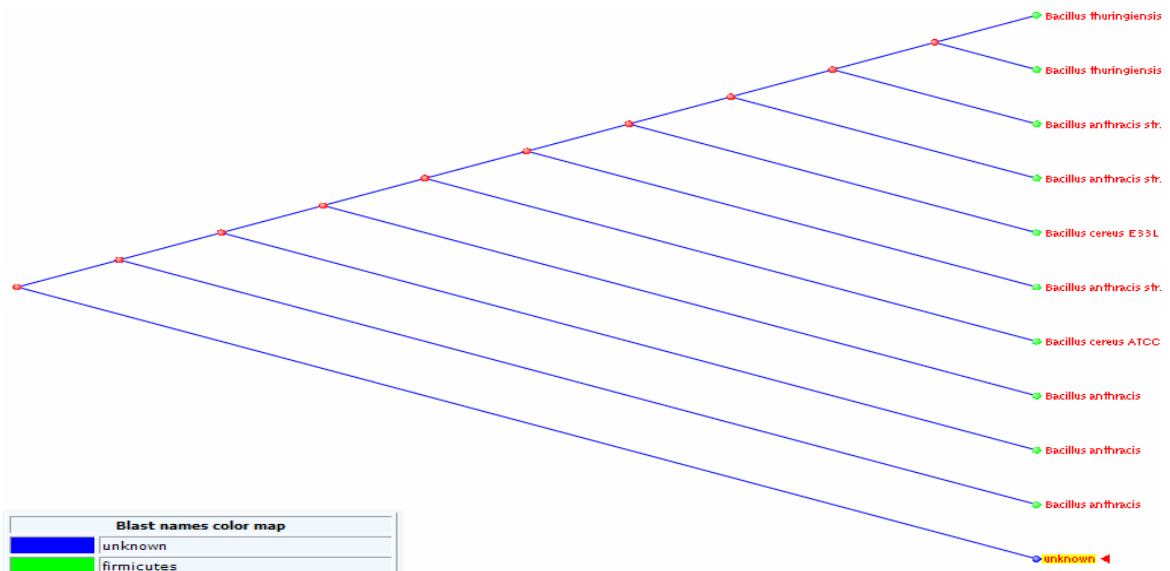


### Primer: GPR-1

#### Amostras: 30a2A, 30a2C, 30a2E, 30a2F (\*<sup>3</sup>):

- [CP000485Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome](#)
- [AE017355Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome](#)
- [AE017334Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome](#)
- [AE017225Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome](#)
- [CP000001Bacillus cereus E33L, complete genome](#)
- [AE016879Bacillus anthracis str. Ames, complete genome](#)
- [AE017194Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome](#)
- [L48554Bacillus anthracis \(strain Vollum\) vrrA gene, complete cds](#)
- [L48553Bacillus anthracis \(strain Sterne\) vrrA gene, complete cds](#)
- [L48552Bacillus anthracis \(strain Ames\) vrrA gene, complete cds](#)

Accession	Start	Sequence	End
*3	390	ACGTACACGCCGCATTAGATACATCAT	416
<a href="#">CP000485</a>	4091576	.....-.....	4091601
<a href="#">AE017355</a>	4092495	.....-.....	4092520
<a href="#">AE017334</a>	4104686	.....-.....	4104711
<a href="#">AE017225</a>	4105060	.....-.....	4105085
<a href="#">CP000001</a>	4146712	.....-.....	4146737
<a href="#">AE016879</a>	4104559	.....-.....	4104584
<a href="#">AE017194</a>	4052983	.....-.....	4053008
<a href="#">L48554</a>	1152	.....-.....	1177
<a href="#">L48553</a>	1176	.....-.....	1201
<a href="#">L48552</a>	1175	.....-.....	1200



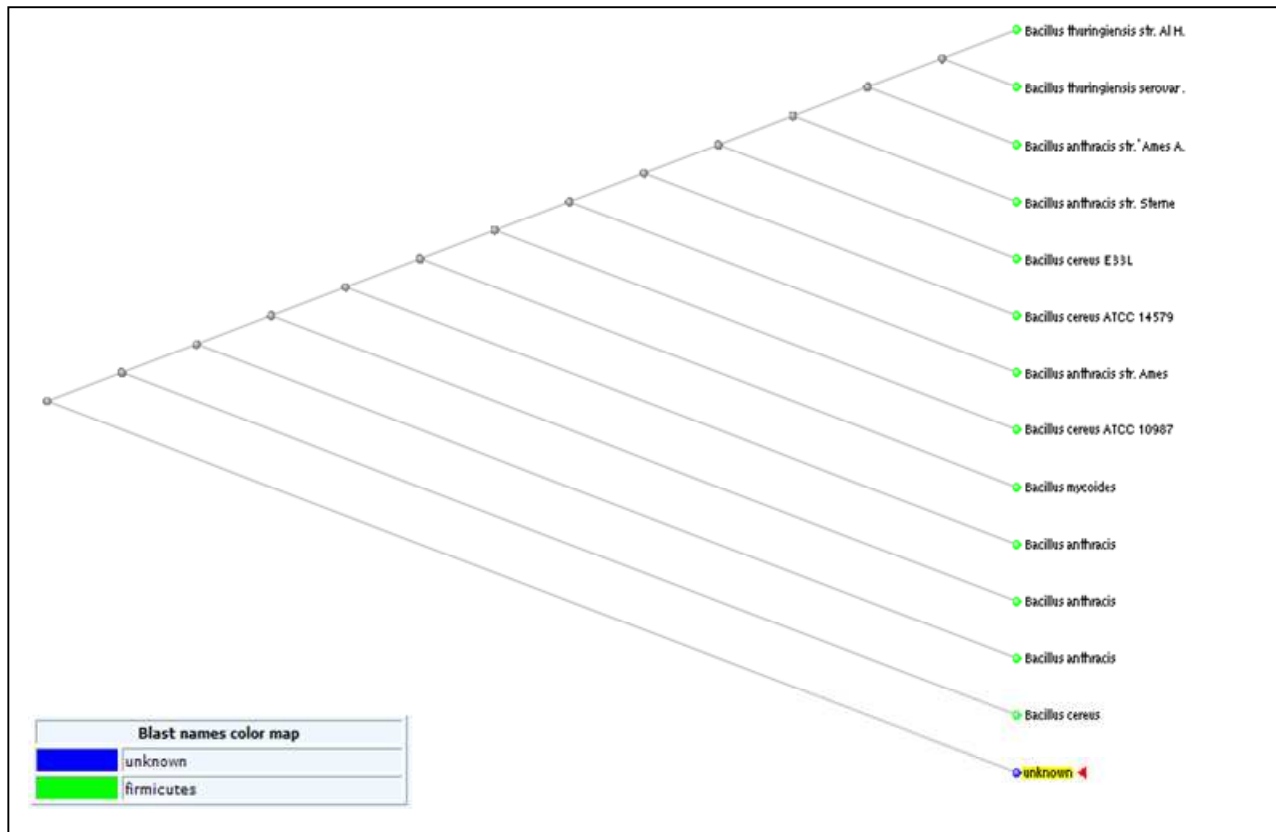
**Primer: GPR-2****Amostras: 30a2B, 30a2I seguiram a mesma similaridade (\*4):**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP000485.1</a>	Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%
<a href="#">AE017355.1</a>	Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%
<a href="#">AE017334.2</a>	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome	<a href="#">48.2</a>	154	23%	3e-04	100%
<a href="#">AE017225.1</a>	Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome	<a href="#">48.2</a>	154	23%	3e-04	100%
<a href="#">CP000001.1</a>	Bacillus cereus E33L, complete genome	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%
<a href="#">AE016879.1</a>	Bacillus anthracis str. Ames, complete genome	<a href="#">48.2</a>	154	23%	3e-04	100%
<a href="#">AE017194.1</a>	Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%
<a href="#">L48554.1</a>	Bacillus anthracis (strain Vollum) vrrA gene, complete cds	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%
<a href="#">L48553.1</a>	Bacillus anthracis (strain Sterne) vrrA gene, complete cds	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%
<a href="#">L48552.1</a>	Bacillus anthracis (strain Ames) vrrA gene, complete cds	<a href="#">48.2</a>	87.3	14%	3e-04	100%

**Amostra: 31b2A (idem) (\*4):**

[CP000485](#)Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome  
[AE017355](#)Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27, complete genome  
[AE017334](#)Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome  
[AE017225](#)Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome  
[CP000001](#)Bacillus cereus E33L, complete genome  
[AE016877](#)Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome  
[AE016879](#)Bacillus anthracis str. Ames, complete genome  
[AE017194](#)Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome  
[L48556](#)Bacillus mycoides (library ATCC 6462) vrrA gene  
[L48554](#)Bacillus anthracis (strain Vollum) vrrA gene, complete cds  
[L48553](#)Bacillus anthracis (strain Sterne) vrrA gene, complete cds  
[L48552](#)Bacillus anthracis (strain Ames) vrrA gene, complete cds  
[L48555](#)Bacillus cereus (library ATCC 14579) vrrA gene

*4	1	CGTAGITTCACGAACTGCATCTGTCTTTACACGTTGGCCTCTTGAGCTGCCTGCCAGAA	60
<a href="#">CP000485</a>	4090433	.....	4090453
<a href="#">AE017355</a>	4091364	.....	4091384
<a href="#">AE017334</a>	4103514	.....	4103534
<a href="#">AE017225</a>	4103887	.....	4103907
<a href="#">CP000001</a>	4145557	.....	4145577
<a href="#">AE016877</a>	4228853	.....	4228873
<a href="#">AE016879</a>	4103387	.....	4103407
<a href="#">AE017194</a>	4051843	.....	4051863
<a href="#">L48556</a>	3	.....	23
<a href="#">L48554</a>	3	.....	23
<a href="#">L48553</a>	3	.....	23
<a href="#">L48552</a>	3	.....	23
<a href="#">L48555</a>	3	.....	23
*4	61	TCTGCTCTGCCTGATTGCCGCTGGTCTGCTTGGAAACGCTCGATAATCTCATAAGCTTCCT	120
*4	121	TGCCTGCCTCTTGCAATGCAGCCTTCTGCTCCTCAACATACTGAGAAGCTTGTTCACGTG	180
*4	181	TTTGTITAGCTTCTTCCAATTGTCCTTGAACCAAGTTGACGCCGATTAGATACATCAT	238
<a href="#">CP000485</a>	4091581	.....	4091601
<a href="#">AE017355</a>	4092500	.....	4092520
<a href="#">AE017334</a>	4104691	.....	4104711
<a href="#">AE017225</a>	4105065	.....	4105085
<a href="#">CP000001</a>	4146717	.....	4146737
<a href="#">AE016879</a>	4104564	.....	4104584
<a href="#">AE017194</a>	4052988	.....	4053008
<a href="#">L48554</a>	1157	.....	1177
<a href="#">L48553</a>	1181	.....	1201
<a href="#">L48552</a>	1180	.....	1200



### Amostra: 34a1R:

[CP000817Lysinibacillus sphaericus C3-41, complete genome](#)

[CP000903Bacillus weihenstephanensis KBAB4, complete genome](#)

[CP000903Bacillus weihenstephanensis KBAB4, complete genome](#)

[AE017334Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome](#)

[AE017334Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor', complete genome](#)

[AE017225Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome](#)

[AE017225Bacillus anthracis str. Sterne, complete genome](#)

[AE016879Bacillus anthracis str. Ames, complete genome](#)

[AE016879Bacillus anthracis str. Ames, complete genome](#)

[AE017194Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome](#)

[AE017194Bacillus cereus ATCC 10987, complete genome](#)

[CP000485Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome](#)

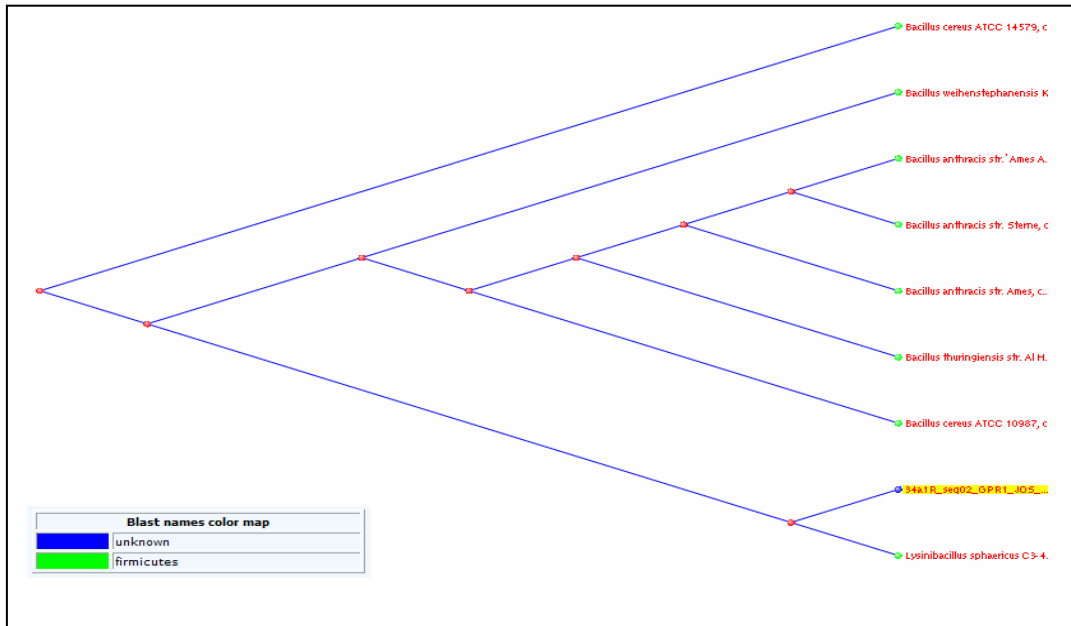
[CP000485Bacillus thuringiensis str. Al Hakam, complete genome](#)

[AE016877Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome](#)

[AE016877Bacillus cereus ATCC 14579, complete genome](#)

34a1R	1	CGTAGTTCACGAACTGCATCTAATTGCGCCTTTAGCTGTGGTAATTGATCGCTATGGAAT	60
<a href="#">CP000817</a>	2030501	..G....TG.T...A.T...A..T....AT.....G..A.....	2030447
<a href="#">CP000903</a>	2795040		.... 2795043
<a href="#">CP000903</a>	4141797	.....	4141818
<a href="#">AE017334</a>	2726020		.... 2726023
<a href="#">AE017334</a>	4103514	.....	4103535
<a href="#">AE017225</a>	2726355		.... 2726358
<a href="#">AE017225</a>	4103887	.....	4103908
<a href="#">AE016879</a>	2725892		.... 2725895
<a href="#">AE016879</a>	4103387	.....	4103408
<a href="#">AE017194</a>	2807657		.... 2807660
<a href="#">AE017194</a>	4051843	.....	4051864
<a href="#">CP000485</a>	2801706		.... 2801709
<a href="#">CP000485</a>	4090433	.....	4090454
<a href="#">AE016877</a>	2900127		.... 2900130
<a href="#">AE016877</a>	4228853	.....	4228874
34a1R	61	TGGTCAACGATTGCTGCTGCAATTTCCCATGCAATATCATGCTCAGCTACAACCTGAAGCC	120
<a href="#">CP000817</a>	2030446	..T..C.AA..AA.A.TC..T.....G.....A.....C.....T..A	2030387
<a href="#">CP000903</a>	2795044	..C..G..T.G...AC.G...G.....CGA..GCT.....ACCT..T	2795103
<a href="#">AE017334</a>	2726024	..T..G..T.G...ATG.....G.....T.C.A..GAT.....T..ACCT..T	2726083
<a href="#">AE017225</a>	2726359	..T..G..T.G...ATG.....G.....T.C.A..GAT.....T..ACCT..T	2726418
<a href="#">AE016879</a>	2725896	..T..G..T.G...ATG.....G.....T.C.A..GAT.....T..ACCT..T	2725955
<a href="#">AE017194</a>	2807661	..T..G..T.G...ATG.....G.....T.C.A..GAT.....T..ACCT..T	2807720
<a href="#">CP000485</a>	2801710	..T..G..T.G...ATG.....G.....T.C.A..GAT.....T..ACCT..T	2801769
<a href="#">AE016877</a>	1469666		...T 1469663
<a href="#">AE016877</a>	2900131	..T..G..T.G...AT.....G.....C.C.A..GAT.....T..ACCC...	2900190
34a1R	121	GCTGGTACTG-ACAGCTATCACTACGCTCAACGCTCGCTTTAAATGTTTCTTTGTTTTG	179
<a href="#">CP000817</a>	2030386	.....C.C.....G..CGA.....T..A..T.....C.GC....T....A	2030327
<a href="#">CP000903</a>	2795104	.....C.....GAT..T....TA.....GG..C.C.....A..A	2795163
<a href="#">AE017334</a>	2726084	.....C.....GAT..TT....TA.....GG...C.....A..A	2726143
<a href="#">AE017225</a>	2726419	.....C.....GAT..TT....TA.....GG...C.....A..A	2726478
<a href="#">AE016879</a>	2725956	.....C.....GAT..TT....TA.....GG...C.....A..A	2726015
<a href="#">AE017194</a>	2807721	.....C.....CGAC..TT....TA.....G...C.....A..A	2807780
<a href="#">CP000485</a>	2801770	.....C.....GAT..TT....TA.....GG...C.....A..A	2801829
<a href="#">AE016877</a>	1469662	.....C...C...A.....TGA...T...T.....G...A.GC.....A..A	1469603
<a href="#">AE016877</a>	2900191	.....CG..A.....GAT..TT....TA.....GG...C.....A..A	2900250
34a1R	180	ATATCTACACIGTTTAAACGGCTTATACAGCGTTGGAATTGGTTTCATTACGCCGATTAG	239
<a href="#">CP000817</a>	2030326	.....C.....T.G...T..T.....T.AT.....A..	2030274
<a href="#">CP000903</a>	2795164	.....G..TGC.....T.....T.AT..A.....C.....	2795216
<a href="#">AE017334</a>	2726144	.....A.....TGC.....T..G..T.AT..A..T.....A..	2726196
<a href="#">AE017334</a>	4104691		..... 4104702
<a href="#">AE017225</a>	2726479	.....A.....TGC.....T..G..T.AT..A..T.....A..	2726531
<a href="#">AE017225</a>	4105065		..... 4105076
<a href="#">AE016879</a>	2726016	.....A.....TGC.....T..G..T.AT..A..T.....A..	2726068
<a href="#">AE016879</a>	4104564		..... 4104575
<a href="#">AE017194</a>	2807781	.....A.....TGC.....T..G..T.AT..A..T.....A..	2807833
<a href="#">AE017194</a>	4052988		..... 4052999
<a href="#">CP000485</a>	2801830	.....A..G..TGC.....T..G..T.AT..A..T.....A..	2801882
<a href="#">CP000485</a>	4091581		..... 4091592
<a href="#">AE016877</a>	1469602	.....T.GA.GA..T....A..T..A..T..C.....C..A....	1469548
<a href="#">AE016877</a>	2900251	.....A..G..TGC.....T..G..T.AA..A.....C.....C.....	2900303
34a1R	240	ATACATCAT	248
<a href="#">AE017334</a>	4104703	.....	4104711
<a href="#">AE017225</a>	4105077	.....	4105085
<a href="#">AE016879</a>	4104576	.....	4104584
<a href="#">AE017194</a>	4053000	.....	4053008
<a href="#">CP000485</a>	4091593	.....	4091601

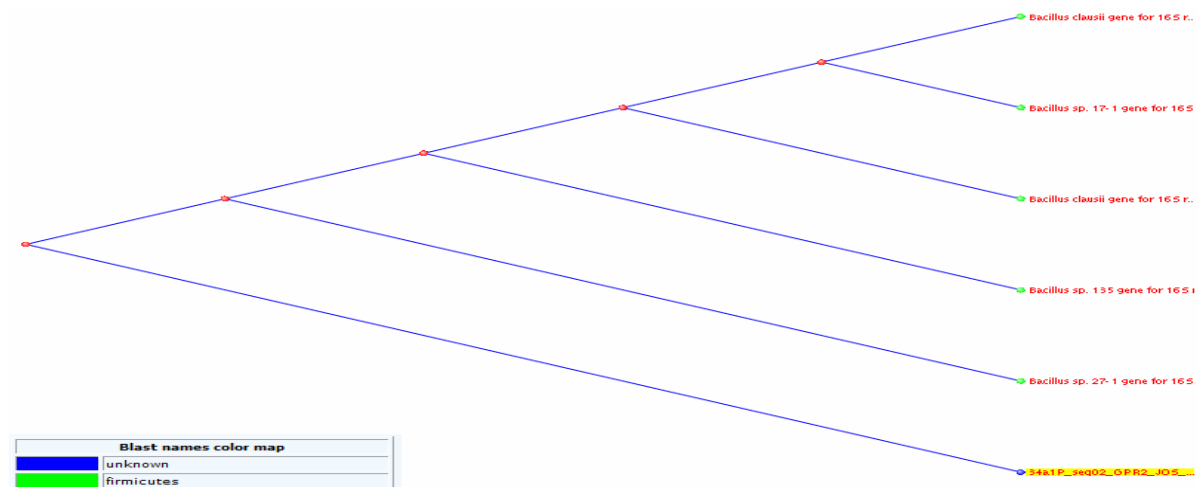




**Amostra: 34a1P (Gpr2):**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AB201800.1</a>	Bacillus clausii gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:M-29-A	<a href="#">87.8</a>	87.8	36%	5e-17	100%
<a href="#">AB043843.1</a>	Bacillus sp. 17-1 gene for 16S rRNA	<a href="#">86.0</a>	86.0	35%	2e-16	100%
<a href="#">AB201801.1</a>	Bacillus clausii gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:M-29-B	<a href="#">80.6</a>	80.6	33%	8e-15	100%
<a href="#">AB043840.1</a>	Bacillus sp. 135 gene for 16S rRNA	<a href="#">73.4</a>	73.4	30%	1e-12	100%
<a href="#">AB043845.1</a>	Bacillus sp. 27-1 gene for 16S rRNA	<a href="#">48.2</a>	48.2	19%	4e-05	100%
<a href="#">CP000903.1</a>	Bacillus weihenstephanensis KBAB4, complete genome	<a href="#">39.2</a>	108	43%	0.023	100%

34a1P	85	CGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTA	132
<a href="#">AB201800</a>	1515	.....	1562
<a href="#">AB043843</a>	1512	.....	1558
<a href="#">AB201801</a>	1517	.....	1560
<a href="#">AB043840</a>	1515	.....	1554
<a href="#">AB043845</a>	1516	.....	1541



## Primer: 29F

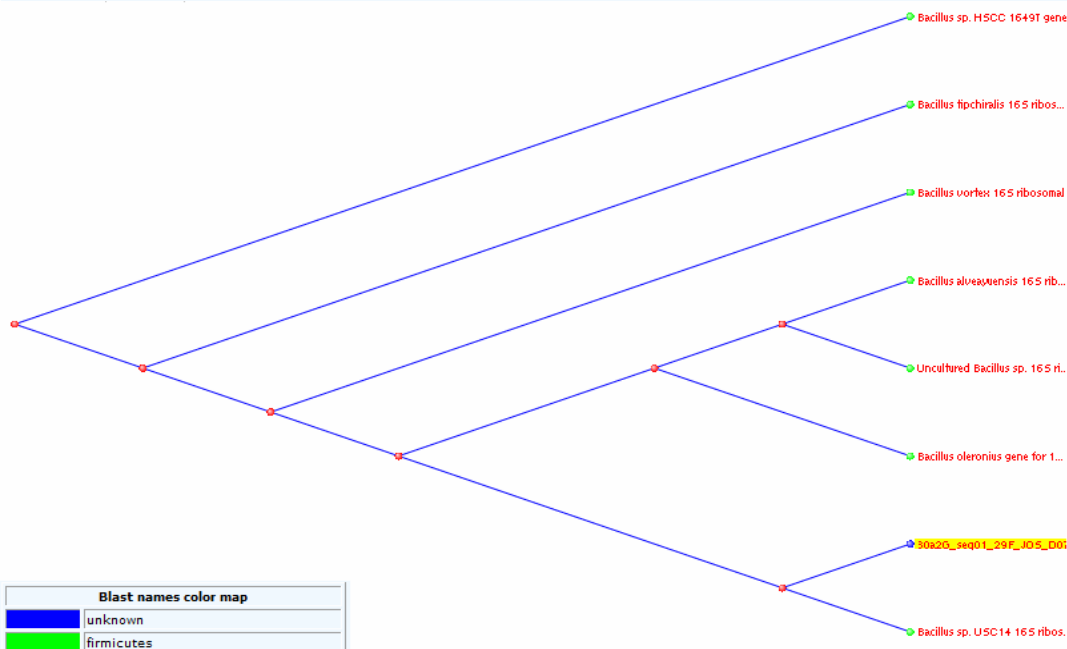
### Amostras: 30a2G, 30a2M, 30a2P (\*5):

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AF039409.1</a>	Bacillus vortex 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">150</a>	150	59%	7e-36	93%
<a href="#">AF039408.1</a>	Bacillus tipchiralis 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">149</a>	149	59%	2e-35	92%
<a href="#">AF346495.1</a>	Bacillus sp. USC14 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">138</a>	138	50%	4e-32	96%
<a href="#">AB045097.1</a>	Bacillus sp. HSCC 1649T gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">138</a>	138	59%	4e-32	90%
<a href="#">AB190029.1</a>	Bacillus oleronius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:N-14-25-2	<a href="#">134</a>	134	59%	5e-31	91%
<a href="#">AY606801.1</a>	Bacillus alveayuensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">134</a>	134	59%	5e-31	91%
<a href="#">AY862489.1</a>	Uncultured Bacillus sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">134</a>	134	59%	5e-31	91%

```

*5      1      TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCGTGCCTTATACATGCAAGTCGAGCGGACTTGATGGA 60
AF039409 21      .....GAC.....A.....C..... 80
AF039408 21      .....GAC.....A.....G..... 80
AF346495  5      .....A..... 49
AB045097  6      .....AC.....A.....G.....AG 65
AB190029 13      .....GAC.....A.....A.T.....- 71
AY606801 13      .....GAC.....A.....-G..A... 71
AY862489  2      .....GAC.....A.....A.....- 60

*5      61      GAGCTTGCTCTCCTGAT-GGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT 102
AF039409 81      .T.....A.....-..... 121
AF039408 81      .T.....A.....-C..... 122
AF346495 50      .....A..... 91
AB045097 66      .T.....A.CT.....-..... 106
AB190029 72      .....-.....-A..... 111
AY606801 72      .....--C..... 111
AY862489 61      .....-.....A-A..... 100
    
```

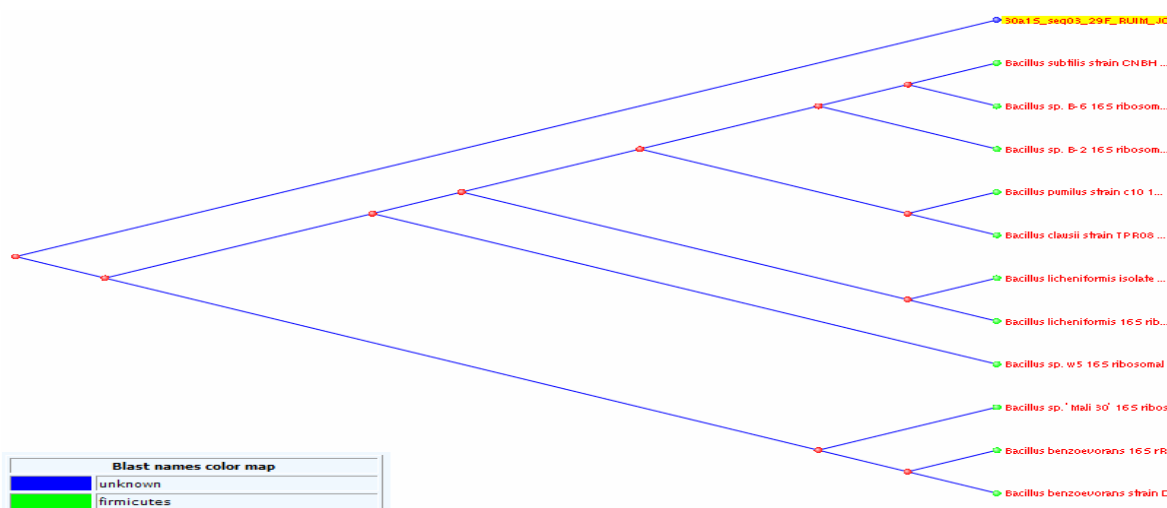


Blast names color map	
■	unknown
■	firmicutes

### Amostra: 30a1S

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF173323.1</a>	Bacillus licheniformis isolate MKI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.7	98.7	48%	3e-20	89%
<a href="#">EU024114.1</a>	Bacillus subtilis strain CNBH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">AY336076.1</a>	Bacillus licheniformis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">AY211124.1</a>	Bacillus sp. 'Mali 30' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">AY373362.1</a>	Bacillus sp. w5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">AY373359.1</a>	Bacillus pumilus strain c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">AY189749.1</a>	Bacillus sp. B-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">AY189745.1</a>	Bacillus sp. B-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">Y14693.1</a>	Bacillus benzoevorans 16S rRNA gene, partial	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">D78311.1</a>	Bacillus benzoevorans strain DSM5391 DNA for 16S ribosomal RNA, partial sequence	96.9	96.9	51%	1e-19	87%
<a href="#">EU373404.1</a>	Bacillus clausii strain TPR08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.1	95.1	68%	4e-19	77%

30a1S	1	TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACNTNNNGGA	60
<a href="#">EF173323</a>	1	.....CGACG...	56
<a href="#">EU024114</a>	16	.....AC.....AGATG...	75
<a href="#">AY336076</a>	8	.....AC.....CGACG...	67
<a href="#">AY211124</a>	30	.....GA.....A..T.TTG...	89
<a href="#">AY373362</a>	1	.....AC.....TC.CAG...	60
<a href="#">AY373359</a>	27	.....AC.....AGAAG...	86
<a href="#">AY189749</a>	13	.....AC.....AGATG...	72
<a href="#">AY189745</a>	13	.....AC.....AGATG...	72
<a href="#">Y14693</a>	11	.....GAC.....T.TTG...	70
<a href="#">D78311</a>	14	.....GAC.....T.TTG...	73
<a href="#">EU373404</a>	16	.....GAC.....AGAAG...	75
30a1S	61	NCTTGNICCCNCNCGNATNGNCGGACAGGGGAG	94
<a href="#">EF173323</a>	57	G....C....	66
<a href="#">EU024114</a>	76	G....C....	85
<a href="#">AY336076</a>	68	G....C....	77
<a href="#">AY211124</a>	90	G....C....	99
<a href="#">AY373362</a>	61	G....C....	70
<a href="#">AY373359</a>	87	G....C....	96
<a href="#">AY189749</a>	73	G....C....	82
<a href="#">AY189745</a>	73	G....C....	82
<a href="#">Y14693</a>	71	G....C....	80
<a href="#">D78311</a>	74	G....C....	83
<a href="#">EU373404</a>	76	G....C....GGA.GTT.GC.G....G..T...	109



## Primer: 98R

Amostras: 30a2H, 30a2, 30a2O, 30a2Q, 30a2R (\*<sup>6</sup>)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AF039408.1</a>	Bacillus tipchiralis 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">147</a>	147	94%	5e-35	90%
<a href="#">AF039409.1</a>	Bacillus vortex 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">145</a>	145	93%	2e-34	90%
<a href="#">EF371376.1</a>	Bacillus sp. ge15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">132</a>	132	93%	1e-30	89%
<a href="#">AB190029.1</a>	Bacillus oleronius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:N-14-25-2	<a href="#">132</a>	132	93%	1e-30	89%
<a href="#">AF346495.1</a>	Bacillus sp. USC14 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">132</a>	132	80%	1e-30	93%
<a href="#">AJ605773.3</a>	Bacillus sp. K1-5 partial 16S rRNA gene, strain K1-5	<a href="#">131</a>	131	93%	4e-30	89%
<a href="#">DQ448794.1</a>	Bacillus sp. CNJ869 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">131</a>	131	93%	4e-30	89%
<a href="#">DQ448791.1</a>	Bacillus sp. CNJ843 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">131</a>	131	93%	4e-30	89%
<a href="#">DQ448745.1</a>	Bacillus sp. CNJ796 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">131</a>	131	93%	4e-30	89%
<a href="#">AY606801.1</a>	Bacillus alveayuensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">131</a>	131	93%	4e-30	89%
<a href="#">AB045097.1</a>	Bacillus sp. HSCC 1649T gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">131</a>	131	93%	4e-30	87%
<a href="#">EU024114.1</a>	Bacillus subtilis strain CNBH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">129</a>	129	93%	1e-29	90%

```

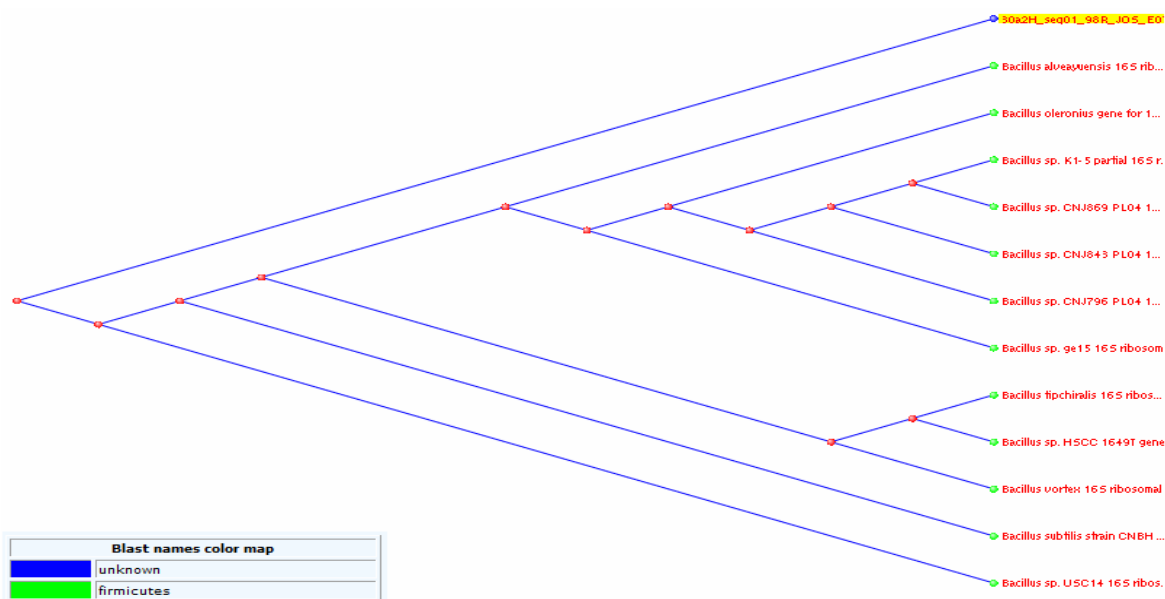
*6      7      ATTACTCACCCGTCGCGCCGNNNNC-ATCAGGAGAGCAAGCTCTCCAICAAGTCCGCTCG      65
AF039408 122      .....TAAG-.....T.....A.....C.....      64
AF039409 121      .....TAAC-.....T.....A.....G.....      64
EF371376 109      .....TGA---.....G---.....      56
AB190029 111      .....TAAT-.....-.....-.....A.T.....      56
AF346495  91      .....TAAC.T.....      33
AJ605773 104      .....TGA--G.....G.....C.....-.....      49
DQ448794 111      .....TGA--G.....G.....C.....-.....      56
DQ448791 111      .....TGA--G.....G.....C.....-.....      56
DQ448745 111      .....TGA--G.....G.....C.....-.....      56
AY606801 111      .....TAA--G.....T..C-.....      56
AB045097 106      .....TAAC-.....AG.T.....A.CT.....C.....      49
EU024114 112      .....TAA--.....-.....-.....T.....      59

```

```

*6      66      ACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGTTCAATCTGAGCCA      108
AF039408  63      .....GTC.....      21
AF039409  63      .....GTC.....      21
EF371376  55      .....GTC.....      13
AB190029  55      .....GTC.....      13
AF346495  32      .....      5
AJ605773  48      .....GTC.....      6
DQ448794  55      .....GTC.....      13
DQ448791  55      .....GTC.....      13
DQ448745  55      .....GTC.....      13
AY606801  55      .....GTC.....      13
AB045097  48      .....GT.....      6
EU024114  58      .....GT.....      16

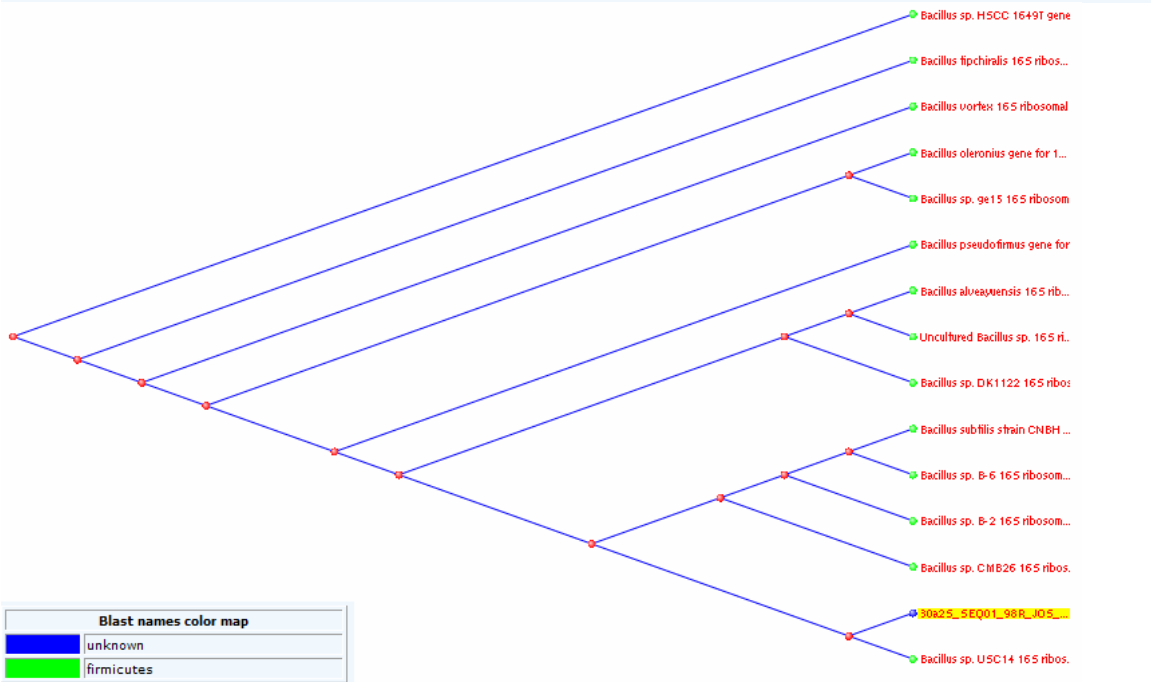
```



### Amostras: 30a2S, 30a2T, 30a2V, 30a2X, 30a2Z (\*<sup>7</sup>)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AF039409.1</a>	Bacillus vortex 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">156</a>	156	93%	9e-38	94%
<a href="#">AF039408.1</a>	Bacillus tipchiralis 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">152</a>	152	94%	1e-36	93%
<a href="#">AF346495.1</a>	Bacillus sp. USC14 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">143</a>	143	80%	6e-34	97%
<a href="#">AB045097.1</a>	Bacillus sp. HSCC 1649T gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">141</a>	141	93%	2e-33	91%
<a href="#">AB190029.1</a>	Bacillus oleronius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:N-14-25-2	<a href="#">140</a>	140	93%	7e-33	92%
<a href="#">AY606801.1</a>	Bacillus alveayuensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">140</a>	140	93%	7e-33	92%
<a href="#">AY862489.1</a>	Uncultured Bacillus sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">140</a>	140	93%	7e-33	92%
<a href="#">EU024114.1</a>	Bacillus subtilis strain CNBH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	93%
<a href="#">EF371376.1</a>	Bacillus sp. ge15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	91%
<a href="#">DQ852633.1</a>	Bacillus sp. DK1122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	93%
<a href="#">AB201795.1</a>	Bacillus pseudofirmus gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:A-40-2	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	93%
<a href="#">AY048851.1</a>	Bacillus sp. CMB26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	92%
<a href="#">AY189749.1</a>	Bacillus sp. B-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	93%
<a href="#">AY189745.1</a>	Bacillus sp. B-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">136</a>	136	93%	9e-32	93%

*7	7	ATTACTCACCCGICCGCCGCTAACC-ATCAGGAGAGCAAGCTCTCCATCAAGICCGCTCG	65
<a href="#">AF039409</a>	121	.....-.....T.....A.....G.....	64
<a href="#">AF039408</a>	122	.....G.....T.....A.....C.....	64
<a href="#">AF346495</a>	91	.....T.....	33
<a href="#">AB045097</a>	106	.....AG.T.....A.CT.....C.....	49
<a href="#">AB190029</a>	111	.....T.....-.....-.....A.T.....	56
<a href="#">AY606801</a>	111	.....G--.....-.....T..C.....	56
<a href="#">AY862489</a>	100	.....T-T.....-.....-.....T.....	45
<a href="#">EU024114</a>	112	.....-.....-.....-.....T.....	59
<a href="#">EF371376</a>	109	.....G.---.....-.....G...--.....	56
<a href="#">DQ852633</a>	109	.....-.....-.....-.....-.....	56
<a href="#">AB201795</a>	99	.....-.....-.....-.....-.....	46
<a href="#">AY048851</a>	110	.....-.....-.....-.....TCT.....	56
<a href="#">AY189749</a>	109	.....-.....-.....-.....T.....	56
<a href="#">AY189745</a>	109	.....-.....-.....-.....T.....	56
*7	66	ACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCCAGCGTTC AATCTGAGCCA	108
<a href="#">AF039409</a>	63	.....GTC.....	21
<a href="#">AF039408</a>	63	.....GTC.....	21
<a href="#">AF346495</a>	32	.....-	5
<a href="#">AB045097</a>	48	.....GT.....	6
<a href="#">AB190029</a>	55	.....GTC.....	13
<a href="#">AY606801</a>	55	.....GTC.....	13
<a href="#">AY862489</a>	44	.....GTC.....	2
<a href="#">EU024114</a>	58	.....GT.....	16
<a href="#">EF371376</a>	55	.....GTC.....	13
<a href="#">DQ852633</a>	55	.....GTC.....	13
<a href="#">AB201795</a>	45	.....GTC.....	3
<a href="#">AY048851</a>	55	.....GT.....	13
<a href="#">AY189749</a>	55	.....GT.....	13
<a href="#">AY189745</a>	55	.....GT.....	13



**Primer: 338F**  
**Amostra: 30a1C**

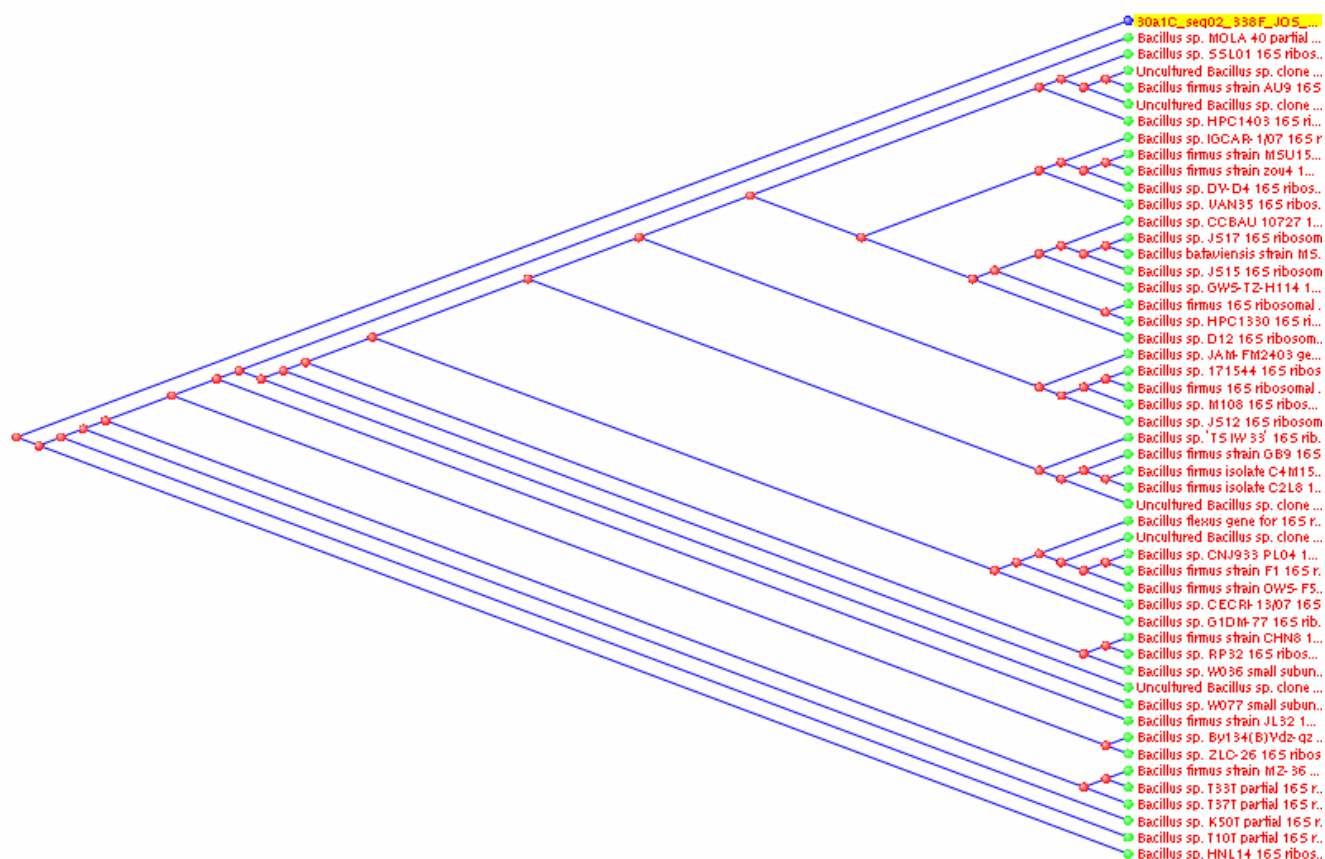
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AM990816.1</a>	Bacillus sp. MOLA 40 partial 16S rRNA gene, culture collection MOLA:40	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU418717.1</a>	Bacillus firmus strain JL32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU070387.1</a>	Bacillus sp. By134(B)Ydz-qz 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU586789.1</a>	Bacillus firmus strain MZ-36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU603328.1</a>	Bacillus sp. ZLC-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AM983531.1</a>	Bacillus sp. K50T partial 16S rRNA gene, isolate K50T	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AM983523.1</a>	Bacillus sp. T10T partial 16S rRNA gene, isolate T10T	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AM983515.1</a>	Bacillus sp. T33T partial 16S rRNA gene, isolate T33T	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AM983514.1</a>	Bacillus sp. T37T partial 16S rRNA gene, isolate T37T	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU373352.1</a>	Bacillus sp. HNL14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU373308.1</a>	Bacillus sp. SSL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AB362289.1</a>	Bacillus sp. JAM-FM2403 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AB361590.1</a>	Bacillus flexus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 681	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU443751.1</a>	Bacillus firmus strain CHN8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU375135.1</a>	Bacillus sp. RP32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EU037267.1</a>	Bacillus sp. G1DM-77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF650916.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone AUVE_01F03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF114179.1</a>	Bacillus sp. W077 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF114138.1</a>	Bacillus sp. W036 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF633685.1</a>	Bacillus sp. 'TS IW 33' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF532911.1</a>	Bacillus sp. CECRI-13/07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF503525.1</a>	Bacillus sp. HPC1403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF517948.1</a>	Bacillus sp. IGCAR-1/07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF377303.1</a>	Bacillus sp. CCBAU 10727 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF101731.1</a>	Bacillus firmus strain GB9 16S ribosomal RNA (rrnE) gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF075393.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2W3_G04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF075071.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2S3_B07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF073708.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WB1W2_G02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">EF032672.1</a>	Bacillus firmus strain AU9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ839175.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone LOTb 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ089747.1</a>	Bacillus firmus isolate C4M15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ073459.1</a>	Bacillus firmus isolate C2L8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ448754.1</a>	Bacillus sp. CNJ933 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ371229.1</a>	Bacillus firmus strain F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY536538.1</a>	Bacillus firmus strain OWS-F5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY647280.1</a>	Bacillus firmus strain MSU1510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ173158.1</a>	Bacillus firmus strain zou4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ166809.1</a>	Bacillus sp. DY-D4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY332197.1</a>	Bacillus sp. GWS-TZ-H114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ118015.1</a>	Bacillus firmus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ104211.1</a>	Bacillus sp. D12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ083485.1</a>	Bacillus sp. HPC1330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AF286486.1</a>	Bacillus sp. VAN35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AF071856.1</a>	Bacillus sp. 171544 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY833571.1</a>	Bacillus firmus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">DQ227667.1</a>	Bacillus sp. M108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY372922.1</a>	Bacillus sp. JS17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY372921.1</a>	Bacillus sp. JS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%
<a href="#">AY372920.1</a>	Bacillus sp. JS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">390</a>	390	81%	8e-108	97%

<a href="#">30a1c</a>	2	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGCATGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG	61
<a href="#">AM990816</a>	289	.....C.....G.G.....	348
<a href="#">EU418717</a>	279	.....C.....G.G.....	338
<a href="#">EU070387</a>	263	.....C.....G.G.....	322
<a href="#">EU586789</a>	227	.....C.....G.G.....	286
<a href="#">EU603328</a>	281	.....C.....G.G.....	340
<a href="#">AM983531</a>	263	.....C.....G.G.....	322
<a href="#">AM983523</a>	296	.....C.....G.G.....	355
<a href="#">AM983515</a>	295	.....C.....G.G.....	354
<a href="#">AM983514</a>	252	.....C.....G.G.....	311
<a href="#">EU373352</a>	322	.....C.....G.G.....	381
<a href="#">EU373308</a>	322	.....C.....G.G.....	381
<a href="#">AB362289</a>	300	.....C.....G.G.....	359
<a href="#">AB361590</a>	285	.....C.....G.G.....	344
<a href="#">EU443751</a>	292	.....C.....G.G.....	351
<a href="#">EU375135</a>	234	.....C.....G.G.....	293
<a href="#">EU037267</a>	319	.....C.....G.G.....	378
<a href="#">EF650916</a>	255	.....C.....G.G.....	314
<a href="#">EF114179</a>	294	.....C.....G.G.....	353
<a href="#">EF114138</a>	295	.....C.....G.G.....	354
<a href="#">EF633685</a>	307	.....C.....G.G.....	366
<a href="#">EF532911</a>	264	.....C.....G.G.....	323
<a href="#">EF503525</a>	300	.....C.....G.G.....	359
<a href="#">EF517948</a>	281	.....C.....G.G.....	340
<a href="#">EF377303</a>	293	.....C.....G.G.....	352
<a href="#">EF101731</a>	260	.....C.....G.G.....	319
<a href="#">EF075393</a>	270	.....C.....G.G.....	329
<a href="#">EF075071</a>	270	.....C.....G.G.....	329
<a href="#">EF073708</a>	269	.....C.....G.G.....	328
<a href="#">EF032672</a>	320	.....C.....G.G.....	379
<a href="#">DQ839175</a>	249	.....C.....G.G.....	308
<a href="#">DQ089747</a>	299	.....C.....G.G.....	358
<a href="#">DQ073459</a>	287	.....C.....G.G.....	346
<a href="#">DQ448754</a>	320	.....C.....G.G.....	379
<a href="#">DQ371229</a>	279	.....C.....G.G.....	338
<a href="#">AY536538</a>	241	.....C.....G.G.....	300
<a href="#">AY647280</a>	297	.....C.....G.G.....	356
<a href="#">DQ173158</a>	320	.....C.....G.G.....	379
<a href="#">DQ166809</a>	103	.....C.....G.G.....	162
<a href="#">AY332197</a>	316	.....C.....G.G.....	375
<a href="#">DQ118015</a>	167	.....C.....G.G.....	226
<a href="#">DQ104211</a>	264	.....C.....G.G.....	323
<a href="#">DQ083485</a>	300	.....C.....G.G.....	359
<a href="#">AF286486</a>	328	.....C.....G.G.....	387
<a href="#">AF071856</a>	297	.....C.....G.G.....	356
<a href="#">AY833571</a>	340	.....C.....G.G.....	399
<a href="#">DQ227667</a>	299	.....C.....G.G.....	358
<a href="#">AY372922</a>	307	.....C.....G.G.....	366
<a href="#">AY372921</a>	311	.....C.....G.G.....	370
<a href="#">AY372920</a>	311	.....C.....G.G.....	370
<a href="#">AY647284</a>	294	.....C.....G.G.....	353
<a href="#">30a1c</a>	62	AAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTT	121
<a href="#">AM990816</a>	349	.....	408
<a href="#">EU418717</a>	339	.....	398
<a href="#">EU070387</a>	323	.....	382
<a href="#">EU586789</a>	287	.....	346
<a href="#">EU603328</a>	341	.....	400
<a href="#">AM983531</a>	323	.....	382
<a href="#">AM983523</a>	356	.....	415
<a href="#">AM983515</a>	355	.....	414
<a href="#">AM983514</a>	312	.....	371
<a href="#">EU373352</a>	382	.....	441
<a href="#">EU373308</a>	382	.....	441
<a href="#">AB362289</a>	360	.....	419
<a href="#">AB361590</a>	345	.....	404
<a href="#">EU443751</a>	352	.....	411
<a href="#">EU375135</a>	294	.....	353
<a href="#">EU037267</a>	379	.....	438
<a href="#">EF650916</a>	315	.....	374
<a href="#">EF114179</a>	354	.....	413
<a href="#">EF114138</a>	355	.....	414



<a href="#">EF633685</a>	367	.....	426
<a href="#">EF532911</a>	324	.....	383
<a href="#">EF503525</a>	360	.....	419
<a href="#">EF517948</a>	341	.....	400
<a href="#">EF377303</a>	353	.....	412
<a href="#">EF101731</a>	320	.....	379
<a href="#">EF075393</a>	330	.....	389
<a href="#">EF075071</a>	330	.....	389
<a href="#">EF073708</a>	329	.....	388
<a href="#">EF032672</a>	380	.....	439
<a href="#">DQ839175</a>	309	.....	368
<a href="#">DQ089747</a>	359	.....	418
<a href="#">DQ073459</a>	347	.....	406
<a href="#">DQ448754</a>	380	.....	439
<a href="#">DQ371229</a>	339	.....	398
<a href="#">AY536538</a>	301	.....	360
<a href="#">AY647280</a>	357	.....	416
<a href="#">DQ173158</a>	380	.....	439
<a href="#">DQ166809</a>	163	.....	222
<a href="#">AY332197</a>	376	.....	435
<a href="#">DQ118015</a>	227	.....	286
<a href="#">DQ104211</a>	324	.....	383
<a href="#">DQ083485</a>	360	.....	419
<a href="#">AF286486</a>	388	.....	447
<a href="#">AF071856</a>	357	.....	416
<a href="#">AY833571</a>	400	.....	459
<a href="#">DQ227667</a>	359	.....	418
<a href="#">AY372922</a>	367	.....	426
<a href="#">AY372921</a>	371	.....	430
<a href="#">AY372920</a>	371	.....	430
<a href="#">AY647284</a>	354	.....	413
<b>30a1C</b>	122	GTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAG	181
<a href="#">AM990816</a>	409	.....	468
<a href="#">EU418717</a>	399	.....	458
<a href="#">EU070387</a>	383	.....	442
<a href="#">EU586789</a>	347	.....	406
<a href="#">EU603328</a>	401	.....	460
<a href="#">AM983531</a>	383	.....	442
<a href="#">AM983523</a>	416	.....	475
<a href="#">AM983515</a>	415	.....	474
<a href="#">AM983514</a>	372	.....	431
<a href="#">EU373352</a>	442	.....	501
<a href="#">EU373308</a>	442	.....	501
<a href="#">AB362289</a>	420	.....	479
<a href="#">AB361590</a>	405	.....	464
<a href="#">EU443751</a>	412	.....	471
<a href="#">EU375135</a>	354	.....	413
<a href="#">EU037267</a>	439	.....	498
<a href="#">EF650916</a>	375	.....	434
<a href="#">EF114179</a>	414	.....	473
<a href="#">EF114138</a>	415	.....	474
<a href="#">EF633685</a>	427	.....	486
<a href="#">EF532911</a>	384	.....	443
<a href="#">EF503525</a>	420	.....	479
<a href="#">EF517948</a>	401	.....	460
<a href="#">EF377303</a>	413	.....	472
<a href="#">EF101731</a>	380	.....	439
<a href="#">EF075393</a>	390	.....	449
<a href="#">EF075071</a>	390	.....	449
<a href="#">EF073708</a>	389	.....	448
<a href="#">EF032672</a>	440	.....	499
<a href="#">DQ839175</a>	369	.....	428
<a href="#">DQ089747</a>	419	.....	478
<a href="#">DQ073459</a>	407	.....	466
<a href="#">DQ448754</a>	440	.....	499
<a href="#">DQ371229</a>	399	.....	458
<a href="#">AY536538</a>	361	.....	420
<a href="#">AY647280</a>	417	.....	476
<a href="#">DQ173158</a>	440	.....	499
<a href="#">DQ166809</a>	223	.....	282
<a href="#">AY332197</a>	436	.....	495

<a href="#">DQ118015</a>	287	.....	346
<a href="#">DQ104211</a>	384	.....	443
<a href="#">DQ083485</a>	420	.....	479
<a href="#">AF286486</a>	448	.....	507
<a href="#">AF071856</a>	417	.....	476
<a href="#">AY833571</a>	460	.....	519
<a href="#">DQ227667</a>	419	.....	478
<a href="#">AY372922</a>	427	.....	486
<a href="#">AY372921</a>	431	.....	490
<a href="#">AY372920</a>	431	.....	490
<a href="#">AY647284</a>	414	.....T.....	473
<b>30a1c</b>	182	CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT	232
<a href="#">AM990816</a>	469	.....T...TG.....	519
<a href="#">EU418717</a>	459	.....T...TG.....	509
<a href="#">EU070387</a>	443	.....T...TG.....	493
<a href="#">EU586789</a>	407	.....T...TG.....	457
<a href="#">EU603328</a>	461	.....T...TG.....	511
<a href="#">AM983531</a>	443	.....T...TG.....	493
<a href="#">AM983523</a>	476	.....T...TG.....	526
<a href="#">AM983515</a>	475	.....T...TG.....	525
<a href="#">AM983514</a>	432	.....T...TG.....	482
<a href="#">EU373352</a>	502	.....T...TG.....	552
<a href="#">EU373308</a>	502	.....T...TG.....	552
<a href="#">AB362289</a>	480	.....T...TG.....	530
<a href="#">AB361590</a>	465	.....T...TG.....	515
<a href="#">EU443751</a>	472	.....T...TG.....	522
<a href="#">EU375135</a>	414	.....T...TG.....	464
<a href="#">EU037267</a>	499	.....T...TG.....	549
<a href="#">EF650916</a>	435	.....T...TG.....	485
<a href="#">EF114179</a>	474	.....T...TG.....	524
<a href="#">EF114138</a>	475	.....T...TG.....	525
<a href="#">EF633685</a>	487	.....T...TG.....	537
<a href="#">EF532911</a>	444	.....T...TG.....	494
<a href="#">EF503525</a>	480	.....T...TG.....	530
<a href="#">EF517948</a>	461	.....T...TG.....	511
<a href="#">EF377303</a>	473	.....T...TG.....	523
<a href="#">EF101731</a>	440	.....T...TG.....	490
<a href="#">EF075393</a>	450	.....T...TG.....	500
<a href="#">EF075071</a>	450	.....T...TG.....	500
<a href="#">EF073708</a>	449	.....T...TG.....	499
<a href="#">EF032672</a>	500	.....T...TG.....	550
<a href="#">DQ839175</a>	429	.....T...TG.....	479
<a href="#">DQ089747</a>	479	.....T...TG.....	529
<a href="#">DQ073459</a>	467	.....T...TG.....	517
<a href="#">DQ448754</a>	500	.....T...TG.....	550
<a href="#">DQ371229</a>	459	.....T...TG.....	509
<a href="#">AY536538</a>	421	.....T...TG.....	471
<a href="#">AY647280</a>	477	.....T...TG.....	527
<a href="#">DQ173158</a>	500	.....T...TG.....	550
<a href="#">DQ166809</a>	283	.....T...TG.....	333
<a href="#">AY332197</a>	496	.....T...TG.....	546
<a href="#">DQ118015</a>	347	.....T...TG.....	397
<a href="#">DQ104211</a>	444	.....T...TG.....	494
<a href="#">DQ083485</a>	480	.....T...TG.....	530
<a href="#">AF286486</a>	508	.....T...TG.....	558
<a href="#">AF071856</a>	477	.....T...TG.....	527
<a href="#">AY833571</a>	520	.....T...TG.....	570
<a href="#">DQ227667</a>	479	.....T...TG.....	529
<a href="#">AY372922</a>	487	.....T...TG.....	537
<a href="#">AY372921</a>	491	.....T...TG.....	541
<a href="#">AY372920</a>	491	.....T...TG.....	541
<a href="#">AY647284</a>	474	.....T...TG.....	524



**30a1R (praticamente não houve diferenças) – o mesmo para 30a1A e 30a1L e com o**

### Primer 531R- 30a1B, E, F, G, H, I, J, M, O, U:

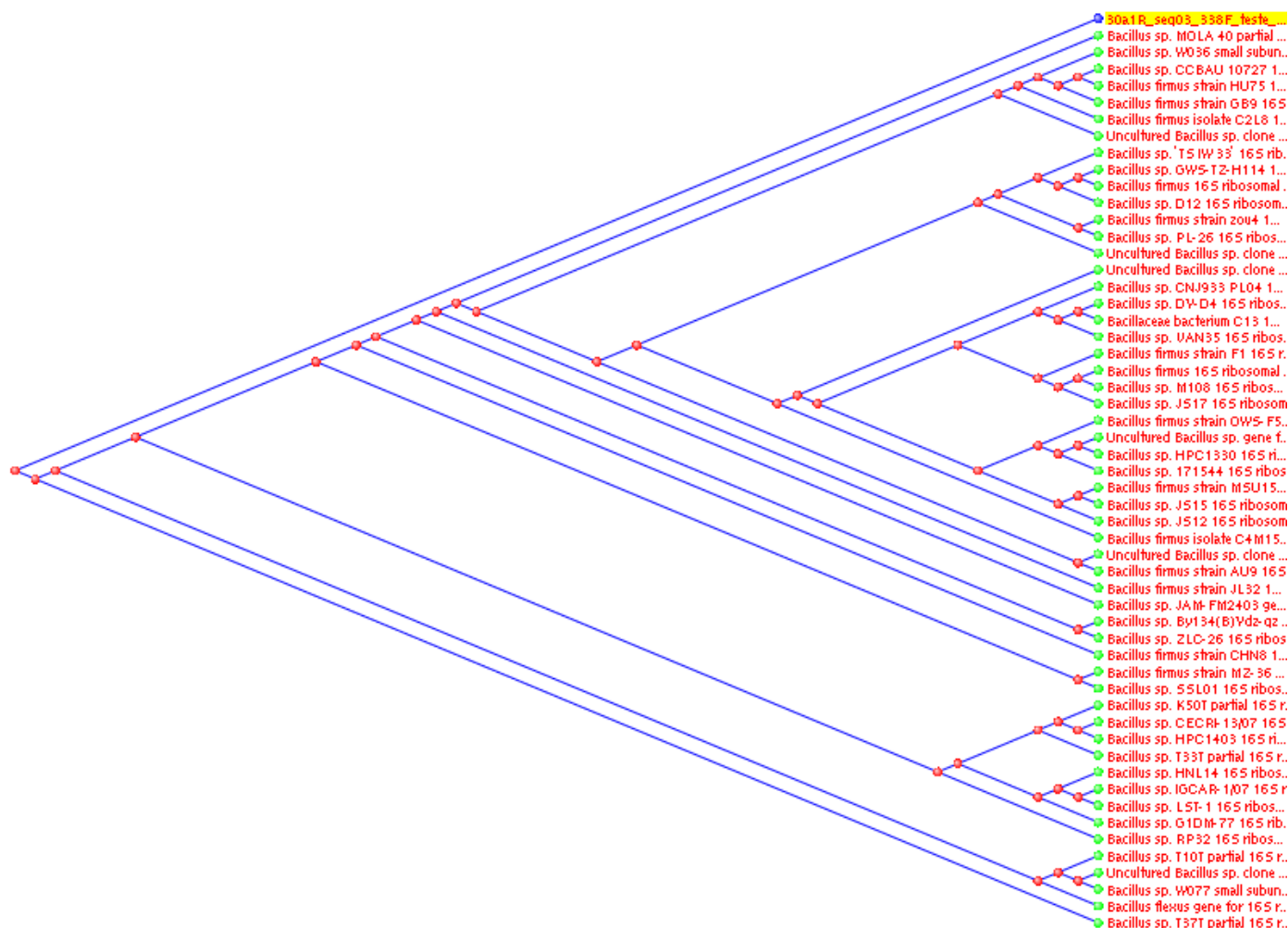
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AM990816.1</a>	Bacillus sp. MOLA 40 partial 16S rRNA gene, culture collection MOLA:40	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU418717.1</a>	Bacillus firmus strain JL32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU070387.1</a>	Bacillus sp. By134(B)Ydz-qz 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU586789.1</a>	Bacillus firmus strain MZ-36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU603328.1</a>	Bacillus sp. ZLC-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AM983531.1</a>	Bacillus sp. K50T partial 16S rRNA gene, isolate K50T	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AM983523.1</a>	Bacillus sp. T10T partial 16S rRNA gene, isolate T10T	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AM983515.1</a>	Bacillus sp. T33T partial 16S rRNA gene, isolate T33T	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AM983514.1</a>	Bacillus sp. T37T partial 16S rRNA gene, isolate T37T	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU373352.1</a>	Bacillus sp. HNL14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU373308.1</a>	Bacillus sp. SSL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AB362289.1</a>	Bacillus sp. JAM-FM2403 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AB361590.1</a>	Bacillus flexus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 681	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU443751.1</a>	Bacillus firmus strain CHN8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU375135.1</a>	Bacillus sp. RP32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EU037267.1</a>	Bacillus sp. G1DM-77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF650916.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone AUVE_01F03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF114179.1</a>	Bacillus sp. W077 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF114138.1</a>	Bacillus sp. W036 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF633685.1</a>	Bacillus sp. 'TS IW 33' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF532911.1</a>	Bacillus sp. CECRI-13/07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF503525.1</a>	Bacillus sp. HPC1403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF517948.1</a>	Bacillus sp. IGCAR-1/07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF395378.1</a>	Bacillus sp. LST-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF377303.1</a>	Bacillus sp. CCBAU 10727 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF101732.1</a>	Bacillus firmus strain HU75 16S ribosomal RNA (rrnE) gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF101731.1</a>	Bacillus firmus strain GB9 16S ribosomal RNA (rrnE) gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF075393.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2W3_G04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF075071.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2S3_B07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF073708.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WB1W2_G02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">EF032672.1</a>	Bacillus firmus strain AU9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ839175.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone LOTb 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ089747.1</a>	Bacillus firmus isolate C4M15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ073459.1</a>	Bacillus firmus isolate C2L8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ448754.1</a>	Bacillus sp. CNJ933 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ371229.1</a>	Bacillus firmus strain FI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY536538.1</a>	Bacillus firmus strain OWS-F5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY647280.1</a>	Bacillus firmus strain MSU1510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ173158.1</a>	Bacillus firmus strain zou4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ166809.1</a>	Bacillus sp. DY-D4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY504439.1</a>	Bacillaceae bacterium C13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY332197.1</a>	Bacillus sp. GWS-TZ-H114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ118015.1</a>	Bacillus firmus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ104211.1</a>	Bacillus sp. D12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AF326369.1</a>	Bacillus sp. PL-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AB159762.1</a>	Uncultured Bacillus sp. gene for 16S rRNA, clone:C46	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ083485.1</a>	Bacillus sp. HPC1330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AF286486.1</a>	Bacillus sp. VAN35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AF071856.1</a>	Bacillus sp. 171544 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY833571.1</a>	Bacillus firmus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">DQ227667.1</a>	Bacillus sp. M108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY372922.1</a>	Bacillus sp. JS17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY372921.1</a>	Bacillus sp. JS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
<a href="#">AY372920.1</a>	Bacillus sp. JS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">325</a>	325	99%	2e-88	97%
30a1R	2	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCCTTTGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG	61			
<a href="#">AM990816</a>	289	.....C.....AGCA.....	348			
<a href="#">EU418717</a>	279	.....C.....AGCA.....	338			
<a href="#">EU070387</a>	263	.....C.....AGCA.....	322			
<a href="#">EU586789</a>	227	.....C.....AGCA.....	286			
<a href="#">EU603328</a>	281	.....C.....AGCA.....	340			
<a href="#">AM983531</a>	263	.....C.....AGCA.....	322			
<a href="#">AM983523</a>	296	.....C.....AGCA.....	355			
<a href="#">AM983515</a>	295	.....C.....AGCA.....	354			
<a href="#">AM983514</a>	252	.....C.....AGCA.....	311			
<a href="#">EU373352</a>	322	.....C.....AGCA.....	381			
<a href="#">EU373308</a>	322	.....C.....AGCA.....	381			
<a href="#">AB362289</a>	300	.....C.....AGCA.....	359			
<a href="#">AB361590</a>	285	.....C.....AGCA.....	344			
<a href="#">EU443751</a>	292	.....C.....AGCA.....	351			
<a href="#">EU375135</a>	234	.....C.....AGCA.....	293			
<a href="#">EU037267</a>	319	.....C.....AGCA.....	378			
<a href="#">EF650916</a>	255	.....C.....AGCA.....	314			
<a href="#">EF114179</a>	294	.....C.....AGCA.....	353			
<a href="#">EF114138</a>	295	.....C.....AGCA.....	354			
<a href="#">EF633685</a>	307	.....C.....AGCA.....	366			
<a href="#">EF532911</a>	264	.....C.....AGCA.....	323			
<a href="#">EF503525</a>	300	.....C.....AGCA.....	359			
<a href="#">EF517948</a>	281	.....C.....AGCA.....	340			

<a href="#">EF395378</a>	300	.....C.....	AGCA.....	359
<a href="#">EF377303</a>	293	.....C.....	AGCA.....	352
<a href="#">EF101732</a>	256	.....C.....	AGCA.....	315
<a href="#">EF101731</a>	260	.....C.....	AGCA.....	319
<a href="#">EF075393</a>	270	.....C.....	AGCA.....	329
<a href="#">EF075071</a>	270	.....C.....	AGCA.....	329
<a href="#">EF073708</a>	269	.....C.....	AGCA.....	328
<a href="#">EF032672</a>	320	.....C.....	AGCA.....	379
<a href="#">DQ839175</a>	249	.....C.....	AGCA.....	308
<a href="#">DQ089747</a>	299	.....C.....	AGCA.....	358
<a href="#">DQ073459</a>	287	.....C.....	AGCA.....	346
<a href="#">DQ448754</a>	320	.....C.....	AGCA.....	379
<a href="#">DQ371229</a>	279	.....C.....	AGCA.....	338
<a href="#">AY536538</a>	241	.....C.....	AGCA.....	300
<a href="#">AY647280</a>	297	.....C.....	AGCA.....	356
<a href="#">DQ173158</a>	320	.....C.....	AGCA.....	379
<a href="#">DQ166809</a>	103	.....C.....	AGCA.....	162
<a href="#">AY504439</a>	323	.....C.....	AGCA.....	382
<a href="#">AY332197</a>	316	.....C.....	AGCA.....	375
<a href="#">DQ118015</a>	167	.....C.....	AGCA.....	226
<a href="#">DQ104211</a>	264	.....C.....	AGCA.....	323
<a href="#">AF326369</a>	307	.....C.....	AGCA.....	366
<a href="#">AB159762</a>	206	.....C.....	AGCA.....	265
<a href="#">DQ083485</a>	300	.....C.....	AGCA.....	359
<a href="#">AF286486</a>	328	.....C.....	AGCA.....	387
<a href="#">AF071856</a>	297	.....C.....	AGCA.....	356
<a href="#">AY833571</a>	340	.....C.....	AGCA.....	399
<a href="#">DQ227667</a>	299	.....C.....	AGCA.....	358
<a href="#">AY372922</a>	307	.....C.....	AGCA.....	366
<a href="#">AY372921</a>	311	.....C.....	AGCA.....	370
<a href="#">AY372920</a>	311	.....C.....	AGCA.....	370
<a href="#">30a1R</a>	62	AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTT		121
<a href="#">AM990816</a>	349	.....	.....	408
<a href="#">EU418717</a>	339	.....	.....	398
<a href="#">EU070387</a>	323	.....	.....	382
<a href="#">EU586789</a>	287	.....	.....	346
<a href="#">EU603328</a>	341	.....	.....	400
<a href="#">AM983531</a>	323	.....	.....	382
<a href="#">AM983523</a>	356	.....	.....	415
<a href="#">AM983515</a>	355	.....	.....	414
<a href="#">AM983514</a>	312	.....	.....	371
<a href="#">EU373352</a>	382	.....	.....	441
<a href="#">EU373308</a>	382	.....	.....	441
<a href="#">AB362289</a>	360	.....	.....	419
<a href="#">AB361590</a>	345	.....	.....	404
<a href="#">EU443751</a>	352	.....	.....	411
<a href="#">EU375135</a>	294	.....	.....	353
<a href="#">EU037267</a>	379	.....	.....	438
<a href="#">EF650916</a>	315	.....	.....	374
<a href="#">EF114179</a>	354	.....	.....	413
<a href="#">EF114138</a>	355	.....	.....	414
<a href="#">EF633685</a>	367	.....	.....	426
<a href="#">EF532911</a>	324	.....	.....	383
<a href="#">EF503525</a>	360	.....	.....	419
<a href="#">EF517948</a>	341	.....	.....	400
<a href="#">EF395378</a>	360	.....	.....	419
<a href="#">EF377303</a>	353	.....	.....	412
<a href="#">EF101732</a>	316	.....	.....	375
<a href="#">EF101731</a>	320	.....	.....	379
<a href="#">EF075393</a>	330	.....	.....	389
<a href="#">EF075071</a>	330	.....	.....	389
<a href="#">EF073708</a>	329	.....	.....	388
<a href="#">EF032672</a>	380	.....	.....	439
<a href="#">DQ839175</a>	309	.....	.....	368
<a href="#">DQ089747</a>	359	.....	.....	418
<a href="#">DQ073459</a>	347	.....	.....	406
<a href="#">DQ448754</a>	380	.....	.....	439
<a href="#">DQ371229</a>	339	.....	.....	398
<a href="#">AY536538</a>	301	.....	.....	360
<a href="#">AY647280</a>	357	.....	.....	416
<a href="#">DQ173158</a>	380	.....	.....	439

<a href="#">DQ166809</a>	163	.....	222
<a href="#">AY504439</a>	383	.....	442
<a href="#">AY332197</a>	376	.....	435
<a href="#">DQ118015</a>	227	.....	286
<a href="#">DQ104211</a>	324	.....	383
<a href="#">AF326369</a>	367	.....	426
<a href="#">AB159762</a>	266	.....	325
<a href="#">DQ083485</a>	360	.....	419
<a href="#">AF286486</a>	388	.....	447
<a href="#">AF071856</a>	357	.....	416
<a href="#">AY833571</a>	400	.....	459
<a href="#">DQ227667</a>	359	.....	418
<a href="#">AY372922</a>	367	.....	426
<a href="#">AY372921</a>	371	.....	430
<a href="#">AY372920</a>	371	.....	430
30a1R	122	GTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAG	181
<a href="#">AM990816</a>	409	.....	468
<a href="#">EU418717</a>	399	.....	458
<a href="#">EU070387</a>	383	.....	442
<a href="#">EU586789</a>	347	.....	406
<a href="#">EU603328</a>	401	.....	460
<a href="#">AM983531</a>	383	.....	442
<a href="#">AM983523</a>	416	.....	475
<a href="#">AM983515</a>	415	.....	474
<a href="#">AM983514</a>	372	.....	431
<a href="#">EU373352</a>	442	.....	501
<a href="#">EU373308</a>	442	.....	501
<a href="#">AB362289</a>	420	.....	479
<a href="#">AB361590</a>	405	.....	464
<a href="#">EU443751</a>	412	.....	471
<a href="#">EU375135</a>	354	.....	413
<a href="#">EU037267</a>	439	.....	498
<a href="#">EF650916</a>	375	.....	434
<a href="#">EF114179</a>	414	.....	473
<a href="#">EF114138</a>	415	.....	474
<a href="#">EF633685</a>	427	.....	486
<a href="#">EF532911</a>	384	.....	443
<a href="#">EF503525</a>	420	.....	479
<a href="#">EF517948</a>	401	.....	460
<a href="#">EF395378</a>	420	.....	479
<a href="#">EF377303</a>	413	.....	472
<a href="#">EF101732</a>	376	.....	435
<a href="#">EF101731</a>	380	.....	439
<a href="#">EF075393</a>	390	.....	449
<a href="#">EF075071</a>	390	.....	449
<a href="#">EF073708</a>	389	.....	448
<a href="#">EF032672</a>	440	.....	499
<a href="#">DQ839175</a>	369	.....	428
<a href="#">DQ089747</a>	419	.....	478
<a href="#">DQ073459</a>	407	.....	466
<a href="#">DQ448754</a>	440	.....	499
<a href="#">DQ371229</a>	399	.....	458
<a href="#">AY536538</a>	361	.....	420
<a href="#">AY647280</a>	417	.....	476
<a href="#">DQ173158</a>	440	.....	499
<a href="#">DQ166809</a>	223	.....	282
<a href="#">AY504439</a>	443	.....	502
<a href="#">AY332197</a>	436	.....	495
<a href="#">DQ118015</a>	287	.....	346
<a href="#">DQ104211</a>	384	.....	443
<a href="#">AF326369</a>	427	.....	486
<a href="#">AB159762</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ083485</a>	420	.....	479
<a href="#">AF286486</a>	448	.....	507
<a href="#">AF071856</a>	417	.....	476
<a href="#">AY833571</a>	460	.....	519
<a href="#">DQ227667</a>	419	.....	478
<a href="#">AY372922</a>	427	.....	486
<a href="#">AY372921</a>	431	.....	490
<a href="#">AY372920</a>	431	.....	490

30a1R	182	CCACGGCTAACTA	194
<a href="#">AM990816</a>	469	.....	481
<a href="#">EU418717</a>	459	.....	471
<a href="#">EU070387</a>	443	.....	455
<a href="#">EU586789</a>	407	.....	419
<a href="#">EU603328</a>	461	.....	473
<a href="#">AM983531</a>	443	.....	455
<a href="#">AM983523</a>	476	.....	488
<a href="#">AM983515</a>	475	.....	487
<a href="#">AM983514</a>	432	.....	444
<a href="#">EU373352</a>	502	.....	514
<a href="#">EU373308</a>	502	.....	514
<a href="#">AB362289</a>	480	.....	492
<a href="#">AB361590</a>	465	.....	477
<a href="#">EU443751</a>	472	.....	484
<a href="#">EU375135</a>	414	.....	426
<a href="#">EU037267</a>	499	.....	511
<a href="#">EF650916</a>	435	.....	447
<a href="#">EF114179</a>	474	.....	486
<a href="#">EF114138</a>	475	.....	487
<a href="#">EF633685</a>	487	.....	499
<a href="#">EF532911</a>	444	.....	456
<a href="#">EF503525</a>	480	.....	492
<a href="#">EF517948</a>	461	.....	473
<a href="#">EF395378</a>	480	.....	492
<a href="#">EF377303</a>	473	.....	485
<a href="#">EF101732</a>	436	.....	448
<a href="#">EF101731</a>	440	.....	452
<a href="#">EF075393</a>	450	.....	462
<a href="#">EF075071</a>	450	.....	462
<a href="#">EF073708</a>	449	.....	461
<a href="#">EF032672</a>	500	.....	512
<a href="#">DQ839175</a>	429	.....	441
<a href="#">DQ089747</a>	479	.....	491
<a href="#">DQ073459</a>	467	.....	479
<a href="#">DQ448754</a>	500	.....	512
<a href="#">DQ371229</a>	459	.....	471
<a href="#">AY536538</a>	421	.....	433
<a href="#">AY647280</a>	477	.....	489
<a href="#">DQ173158</a>	500	.....	512
<a href="#">DQ166809</a>	283	.....	295
<a href="#">AY504439</a>	503	.....	515
<a href="#">AY332197</a>	496	.....	508
<a href="#">DQ118015</a>	347	.....	359
<a href="#">DQ104211</a>	444	.....	456
<a href="#">AF326369</a>	487	.....	499
<a href="#">AB159762</a>	386	.....	398
<a href="#">DQ083485</a>	480	.....	492
<a href="#">AF286486</a>	508	.....	520
<a href="#">AF071856</a>	477	.....	489
<a href="#">AY833571</a>	520	.....	532
<a href="#">DQ227667</a>	479	.....	491
<a href="#">AY372922</a>	487	.....	499
<a href="#">AY372921</a>	491	.....	503
<a href="#">AY372920</a>	491	.....	503



## Primer 338F

Amostras: 31a3C e 31a3D e pouca diferença em 31a3A, 31a3H, 31a3J, 31a3N, 31a3Q, 31a3S, 31a3U

## Primer 531R

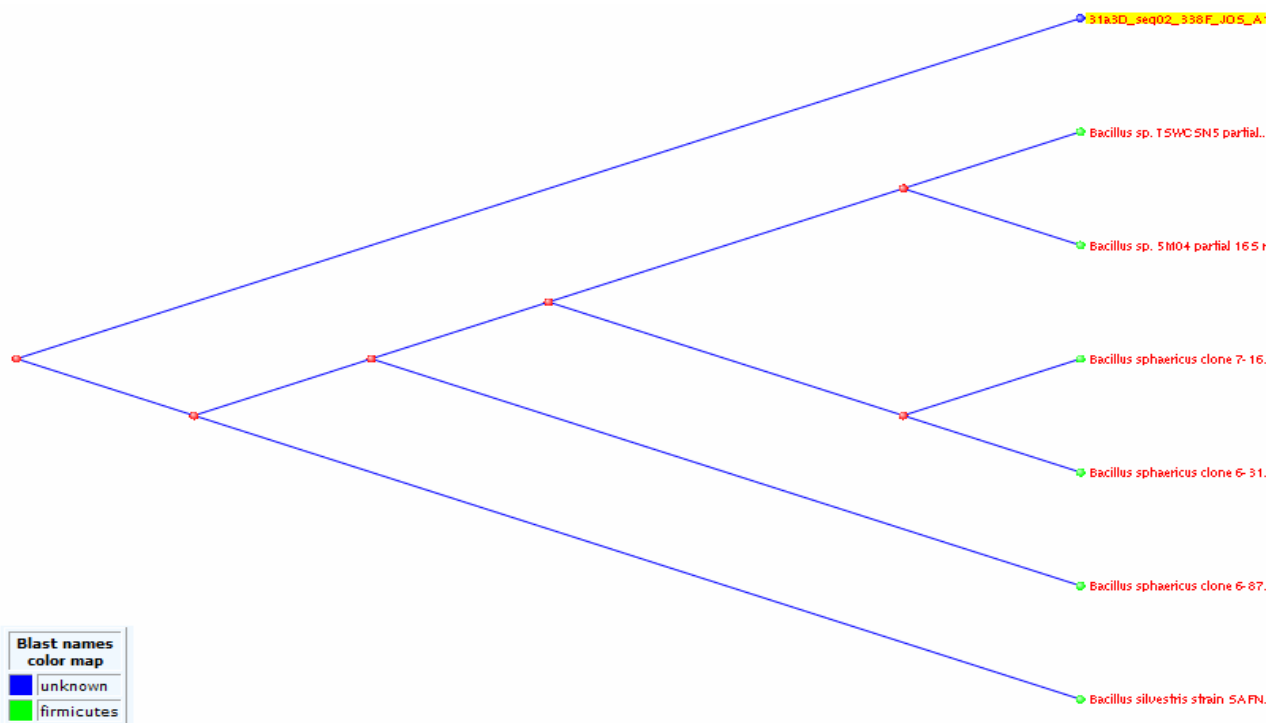
Amostras: 31a3B, 31a3E, 31a3F, 31a3I, 31a3O, 31a3P

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AM888194.1</a>	Bacillus sp. TSWCSN5 partial 16S rRNA gene	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%
<a href="#">AM690037.1</a>	Bacillus sp. 5M04 partial 16S rRNA gene, type strain 5M04	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%
<a href="#">DQ364585.1</a>	Bacillus sphaericus clone 7-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%
<a href="#">DQ364584.1</a>	Bacillus sphaericus clone 6-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%
<a href="#">DQ364583.1</a>	Bacillus sphaericus clone 6-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%
<a href="#">AY167818.1</a>	Bacillus silvestris strain SAFN-010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%

31a3*	2	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGCTTGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG	61
<a href="#">AM888194</a>	285	.....C.....GAG.....	344
<a href="#">AM690037</a>	295	.....C.....GAG.....	354
<a href="#">DQ364585</a>	300	.....C.....GAG.....	359
<a href="#">DQ364584</a>	300	.....C.....GAG.....	359
<a href="#">DQ364583</a>	300	.....C.....GAG.....	359



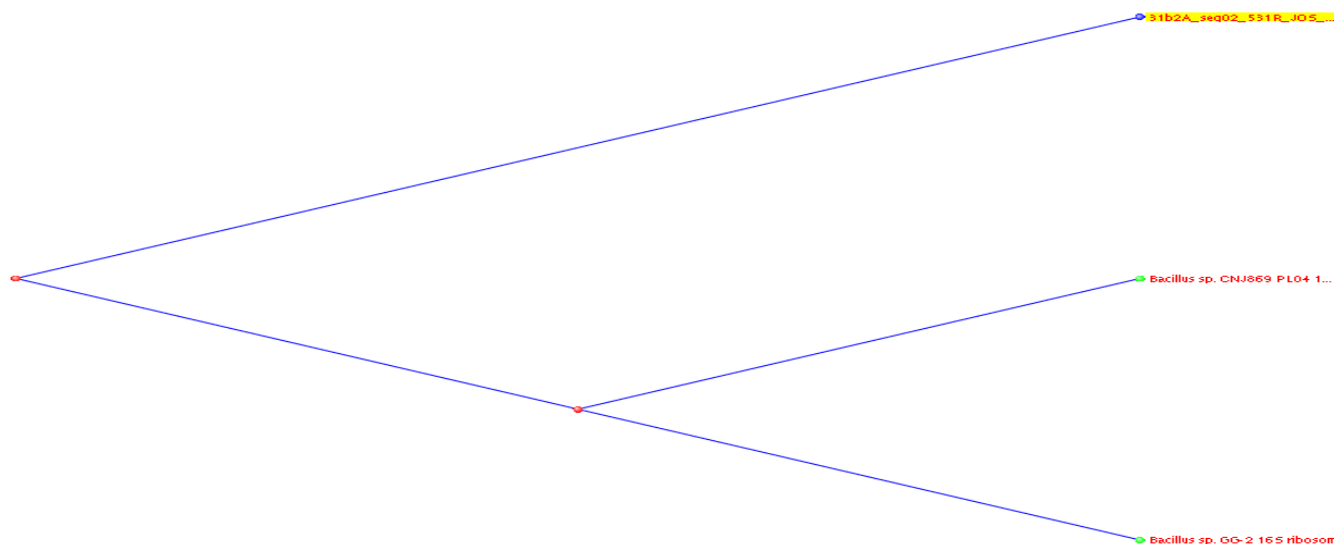
<a href="#">AY167818</a>	231	.....C.....GAG.....	290
31a3*	62	AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTT	121
<a href="#">AM888194</a>	345	.....	404
<a href="#">AM690037</a>	355	.....	414
<a href="#">DQ364585</a>	360	.....	419
<a href="#">DQ364584</a>	360	.....	419
<a href="#">DQ364583</a>	360	.....	419
<a href="#">AY167818</a>	291	.....	350
31a3*	122	GTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAAG	181
<a href="#">AM888194</a>	405	.....	464
<a href="#">AM690037</a>	415	.....	474
<a href="#">DQ364585</a>	420	.....	479
<a href="#">DQ364584</a>	420	.....	479
<a href="#">DQ364583</a>	420	.....	479
<a href="#">AY167818</a>	351	.....	410
31a3*	182	CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT	232
<a href="#">AM888194</a>	465	.....T...TG.....	515
<a href="#">AM690037</a>	475	.....T...TG.....	525
<a href="#">DQ364585</a>	480	.....T...TG.....	530
<a href="#">DQ364584</a>	480	.....T...TG.....	530
<a href="#">DQ364583</a>	480	.....T...TG.....	530
<a href="#">AY167818</a>	411	.....T...TG.....	461



**Primer 531R**  
**Amostra: 31b2A**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">DQ448794.1</a>	Bacillus sp. CNJ869 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">342</a>	342	81%	4e-93	93%
<a href="#">DQ118029.1</a>	Bacillus sp. GG-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">342</a>	342	81%	4e-93	93%
31b2A	1	ACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGGGCTCCCTTAAACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGG	60			
<a href="#">DQ448794</a>	553	.....CA...A.....G-.GGC.....	495			
<a href="#">DQ118029</a>	501	.....CA...A.....G-.GGC.....	443			

31b2A	61	TTAGGTACCGACCAGGTACCGCCCTATTTCGAACGATACTTATTCTTCCCTAACACCTGAG	120
<a href="#">DQ448794</a>	494	.....T.A.....G.....A.A...	435
<a href="#">DQ118029</a>	442	.....T.A.....G.....A.A...	383
31b2A	121	CTTTACGACCCGAAGGCCTTCTTCGATCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCAT	180
<a href="#">DQ448794</a>	434	.....C.....	375
<a href="#">DQ118029</a>	382	.....C.....	323
31b2A	181	TGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGGAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA	231
<a href="#">DQ448794</a>	374	.....T.....G.....	324
<a href="#">DQ118029</a>	322	.....T.....G.....	272



## Primer 338F

Amostra: 34a1B, 34a1E, 34a1I, 34a1J, 34a1L, 34a1O:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF072549.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WA2S1_B09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	401	401	81%	4e-111	98%
<a href="#">EU563231.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain 12170500 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU168418.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain IBL10B1445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU445339.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain PBCC2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ416784.1</a>	Bacillus sp. G1DM-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">CP000817.1</a>	Lysinibacillus sphaericus C3-41, complete genome	399	3982	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM934694.1</a>	Lysinibacillus sp. CL1.22 partial 16S rRNA gene, strain CL1.22	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB245423.1</a>	Lysinibacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB244482.1</a>	Lysinibacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: limp 5-1	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB330401.1</a>	Bacillus sp. BAM585 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB330399.1</a>	Bacillus sp. BAM581 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB330396.1</a>	Bacillus sp. BAM542 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB330394.1</a>	Bacillus sp. BAM539 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU304958.1</a>	Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain 3EC5C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU304957.1</a>	Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain 3EC5C2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ826583.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ826582.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ826581.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ826580.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU252508.1</a>	Bacillus sp. AM20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU236749.1</a>	Bacillus sp. Z22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	81%	2e-110	98%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EU236728.1</a>	Bacillus sp. X5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM903104.1</a>	Bacillus sphaericus 16S rRNA gene, isolate JG-7B	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU187498.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain X-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU187497.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain X-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU187493.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain X-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU187490.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain X-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EU182861.1</a>	Lysinibacillus sp. MH33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB363739.1</a>	Lysinibacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3525	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB244290.1</a>	Bacillus sp. A3-2 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A3-2	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF584540.1</a>	Bacillus sp. JDM-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM269451.1</a>	Bacillus sphaericus partial 16S rRNA gene, isolate BS11	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF563985.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain G.C. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM493669.1</a>	Bacillus sphaericus partial 16S rRNA gene	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF101920.1</a>	Bacillus sphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF188283.1</a>	Bacillus sp. LYB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ333290.1</a>	Bacillus cohnii isolate LLF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ333288.1</a>	Bacillus fusiformis isolate LLD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF074984.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2S2_C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF074654.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1W1_E02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF074595.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1S3_E07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF074475.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1S2_C03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">EF032669.1</a>	Bacillus sphaericus strain AU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ923492.1</a>	Bacillus sphaericus strain D45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ923491.1</a>	Bacillus sphaericus strain D35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ923485.1</a>	Bacillus sphaericus strain D19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ923481.1</a>	Bacillus sphaericus strain D12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ916139.1</a>	Bacillus sphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB271743.1</a>	Bacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB271742.1</a>	Bacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ872451.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9h 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ872450.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ872449.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ872447.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM292655.1</a>	Bacillus sphaericus partial 16S rRNA gene, strain JG-A12	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM293004.1</a>	Bacillus sp. JG-B62 partial 16S rRNA gene, isolate JG-B62	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM293002.1</a>	Bacillus sp. JG-B53 partial 16S rRNA gene, isolate JG-B53	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM292996.1</a>	Bacillus fusiformis partial 16S rRNA gene, isolate JG-B7	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AM292621.1</a>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone JG35-U4-KF48	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ643066.1</a>	Bacillus sp. CO64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ499996.1</a>	Bacillus fusiformis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ420188.1</a>	Bacillus sphaericus site5W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ420180.1</a>	Bacillus fusiformis site2W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ420177.1</a>	Bacillus fusiformis site2S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ420173.1</a>	Bacillus fusiformis site8S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ420171.1</a>	Bacillus fusiformis site7S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ451097.1</a>	Bacillus sp. EJB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ279754.1</a>	Bacillus sp. AzoR-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ232748.1</a>	Bacillus sp. JH19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AY822613.1</a>	Bacillus sp. P05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB242674.1</a>	Bacillus sp. 31NP3 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ118033.1</a>	Bacillus sphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB159758.1</a>	Uncultured Bacillus sp. gene for 16S rRNA, clone:C26	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AB159755.1</a>	Uncultured Bacillus sp. gene for 16S rRNA, clone:C20	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ083478.1</a>	Bacillus sp. HPC1315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ083477.1</a>	Bacillus sp. HPC1313 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB167231.1</a>	Bacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:c84	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB167230.1</a>	Bacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:c81	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB167228.1</a>	Bacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:c74	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AB167226.1</a>	Bacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:c70	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AY999030.1</a>	Bacillus sp. HPC353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">AY907676.1</a>	Bacillus fusiformis strain SW-B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ299211.1</a>	Bacillus sp. HPC947 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286360.1</a>	Bacillus sphaericus strain SSII-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286321.1</a>	Bacillus sphaericus strain NRS1184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286320.1</a>	Bacillus sphaericus strain LP1-G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286318.1</a>	Bacillus sphaericus strain KellenQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286317.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB881 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286316.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB872 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286315.1</a>	Bacillus sphaericus strain NRS1693 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286314.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB769 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286313.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB763 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286312.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286311.1</a>	Bacillus sphaericus strain Dak614 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286309.1</a>	Bacillus sphaericus strain C3-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286299.1</a>	Bacillus sphaericus strain ATCC 14577 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286298.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2362 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286297.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2317-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286296.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2314-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<a href="#">DQ286295.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">399</a>	399	81%	2e-110	98%
<b>34a1*</b>	1		AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGC	60		
<a href="#">EF072549</a>	271		. . . . . C . . . . .	330		
<a href="#">EU563231</a>	299		. . . . . C . . . . .	357		
<a href="#">EU168418</a>	251		. . . . . C . . . . .	309		
<a href="#">EU445339</a>	267		. . . . . C . . . . .	325		
<a href="#">DQ416784</a>	324		. . . . . C . . . . .	382		
<a href="#">CP000817</a>	10422		. . . . . C . . . . .	10480		
<a href="#">CP000817</a>	17139		. . . . . C . . . . .	17197		
<a href="#">CP000817</a>	49564		. . . . . C . . . . .	49622		
<a href="#">CP000817</a>	109562		. . . . . C . . . . .	109620		
<a href="#">CP000817</a>	222530		. . . . . C . . . . .	222588		
<a href="#">CP000817</a>	644897		. . . . . C . . . . .	644955		
<a href="#">CP000817</a>	940188		. . . . . C . . . . .	940246		
<a href="#">CP000817</a>	4432806		. . . . . C . . . . .	4432748		
<a href="#">CP000817</a>	358080		. . . . . C . . . . .	358138		
<a href="#">CP000817</a>	759039		. . . . . C . . . . .	759097		
<a href="#">AM934694</a>	248		. . . . . C . . . . .	306		
<a href="#">AB245423</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		
<a href="#">AB244482</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		
<a href="#">AB330401</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		
<a href="#">AB330399</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		
<a href="#">AB330396</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		
<a href="#">AB330394</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		
<a href="#">EU304958</a>	230		. . . . . C . . . . .	288		
<a href="#">EU304957</a>	230		. . . . . C . . . . .	288		
<a href="#">DQ826583</a>	311		. . . . . C . . . . .	369		
<a href="#">DQ826582</a>	311		. . . . . C . . . . .	369		
<a href="#">DQ826581</a>	324		. . . . . C . . . . .	382		
<a href="#">DQ826580</a>	311		. . . . . C . . . . .	369		
<a href="#">EU252508</a>	314		. . . . . C . . . . .	372		
<a href="#">EU236749</a>	300		. . . . . C . . . . .	358		
<a href="#">EU236728</a>	302		. . . . . C . . . . .	360		

<a href="#">AM903104</a>	299	.....C.....	357
<a href="#">EU187498</a>	289	.....C.....	347
<a href="#">EU187497</a>	281	.....C.....	339
<a href="#">EU187493</a>	296	.....C.....	354
<a href="#">EU187490</a>	288	.....C.....	346
<a href="#">EU182861</a>	261	.....C.....	319
<a href="#">AB363739</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">AB244290</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">EF584540</a>	301	.....C.....	359
<a href="#">AM269451</a>	275	.....C.....	333
<a href="#">EF563985</a>	247	.....C.....	305
<a href="#">AM493669</a>	112	.....C.....	170
<a href="#">EF101920</a>	252	.....C.....	310
<a href="#">EF188283</a>	295	.....C.....	353
<a href="#">DQ333290</a>	326	.....C.....	384
<a href="#">DQ333288</a>	312	.....C.....	370
<a href="#">EF074984</a>	275	.....C.....	333
<a href="#">EF074654</a>	275	.....C.....	333
<a href="#">EF074595</a>	276	.....C.....	334
<a href="#">EF074475</a>	276	.....C.....	334
<a href="#">EF032669</a>	323	.....C.....	381
<a href="#">DQ923492</a>	278	.....C.....	336
<a href="#">DQ923491</a>	274	.....C.....	332
<a href="#">DQ923485</a>	253	.....C.....	311
<a href="#">DQ923481</a>	287	.....C.....	345
<a href="#">DQ916139</a>	284	.....C.....	342
<a href="#">AB271743</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">AB271742</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">DQ872451</a>	242	.....C.....	300
<a href="#">DQ872450</a>	253	.....C.....	311
<a href="#">DQ872449</a>	253	.....C.....	311
<a href="#">DQ872447</a>	269	.....C.....	327
<a href="#">AM292655</a>	299	.....C.....	357
<a href="#">AM293004</a>	295	.....C.....	353
<a href="#">AM293002</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">AM292996</a>	295	.....C.....	353
<a href="#">AM292621</a>	267	.....C.....	325
<a href="#">DQ643066</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">DQ499996</a>	269	.....C.....	327
<a href="#">DQ420188</a>	301	.....C.....	359
<a href="#">DQ420180</a>	294	.....C.....	352
<a href="#">DQ420177</a>	299	.....C.....	357
<a href="#">DQ420173</a>	272	.....C.....	330
<a href="#">DQ420171</a>	301	.....C.....	359
<a href="#">DQ451097</a>	355	.....C.....	413
<a href="#">DQ279754</a>	281	.....C.....	339
<a href="#">DQ232748</a>	287	.....C.....	345
<a href="#">AY822613</a>	297	.....C.....	355
<a href="#">AB242674</a>	260	.....C.....	318
<a href="#">DQ118033</a>	273	.....C.....	331
<a href="#">AB159758</a>	206	.....C.....	264
<a href="#">AB159755</a>	204	.....C.....	262
<a href="#">DQ083478</a>	304	.....C.....	362
<a href="#">DQ083477</a>	298	.....C.....	356
<a href="#">AB167231</a>	277	.....C.....	335
<a href="#">AB167230</a>	267	.....C.....	325
<a href="#">AB167228</a>	277	.....C.....	335
<a href="#">AB167226</a>	267	.....C.....	325
<a href="#">AY999030</a>	255	.....C.....	313
<a href="#">AY907676</a>	302	.....C.....	360
<a href="#">DQ299211</a>	300	.....C.....	358
<a href="#">DQ286360</a>	272	.....C.....	330
<a href="#">DQ286321</a>	251	.....C.....	309
<a href="#">DQ286320</a>	269	.....C.....	327
<a href="#">DQ286318</a>	281	.....C.....	339
<a href="#">DQ286317</a>	275	.....C.....	333
<a href="#">DQ286316</a>	267	.....C.....	325
<a href="#">DQ286315</a>	272	.....C.....	330
<a href="#">DQ286314</a>	269	.....C.....	327
<a href="#">DQ286313</a>	266	.....C.....	324
<a href="#">DQ286312</a>	274	.....C.....	332
<a href="#">DQ286311</a>	267	.....C.....	325

<a href="#">DQ286309</a>	260	.....C.....	318
<a href="#">DQ286299</a>	279	.....C.....	337
<a href="#">DQ286298</a>	272	.....C.....	330
<a href="#">DQ286297</a>	274	.....C.....	332
<a href="#">DQ286296</a>	274	.....C.....	332
<a href="#">DQ286295</a>	273	.....C.....	331
<b>34a1*</b>	61		
<a href="#">EF072549</a>	331	GAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTCGTAAAACTCTGT	120
<a href="#">EU563231</a>	358	.....	390
<a href="#">EU168418</a>	310	.....	417
<a href="#">EU445339</a>	326	.....	369
<a href="#">DQ416784</a>	383	.....	385
<a href="#">CP000817</a>	10481	.....	442
<a href="#">CP000817</a>	17198	.....	10540
<a href="#">CP000817</a>	49623	.....	17257
<a href="#">CP000817</a>	109621	.....	49682
<a href="#">CP000817</a>	222589	.....	109680
<a href="#">CP000817</a>	644956	.....	222648
<a href="#">CP000817</a>	940247	.....	645015
<a href="#">CP000817</a>	4432747	.....	940306
<a href="#">CP000817</a>	358139	.....	4432688
<a href="#">CP000817</a>	759098	.....	358198
<a href="#">AM934694</a>	307	.....	759157
<a href="#">AB245423</a>	361	.....	366
<a href="#">AB244482</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330401</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330399</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330396</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330394</a>	361	.....	420
<a href="#">EU304958</a>	289	.....	420
<a href="#">EU304957</a>	289	.....	348
<a href="#">DQ826583</a>	370	.....	348
<a href="#">DQ826582</a>	370	.....	429
<a href="#">DQ826581</a>	383	.....	429
<a href="#">DQ826580</a>	370	.....	442
<a href="#">EU252508</a>	373	.....	429
<a href="#">EU236749</a>	359	.....	432
<a href="#">EU236728</a>	361	.....	418
<a href="#">AM903104</a>	358	.....	420
<a href="#">EU187498</a>	348	.....	417
<a href="#">EU187497</a>	340	.....	407
<a href="#">EU187493</a>	355	.....	399
<a href="#">EU187490</a>	347	.....	414
<a href="#">EU182861</a>	320	.....	406
<a href="#">AB363739</a>	361	.....	379
<a href="#">AB244290</a>	361	.....	420
<a href="#">EF584540</a>	360	.....	420
<a href="#">AM269451</a>	334	.....	419
<a href="#">EF563985</a>	306	.....	393
<a href="#">AM493669</a>	171	.....	365
<a href="#">EF101920</a>	311	.....	230
<a href="#">EF188283</a>	354	.....	370
<a href="#">DQ333290</a>	385	.....	413
<a href="#">DQ333288</a>	371	.....	444
<a href="#">EF074984</a>	334	.....	430
<a href="#">EF074654</a>	334	.....	393
<a href="#">EF074595</a>	335	.....	393
<a href="#">EF074475</a>	335	.....	394
<a href="#">EF032669</a>	382	.....	394
<a href="#">DQ923492</a>	337	.....	441
<a href="#">DQ923491</a>	333	.....	396
<a href="#">DQ923485</a>	312	.....	392
<a href="#">DQ923481</a>	346	.....	371
<a href="#">DQ916139</a>	343	.....	405
<a href="#">AB271743</a>	361	.....	402
<a href="#">AB271742</a>	361	.....	420
<a href="#">DQ872451</a>	301	.....	420
<a href="#">DQ872450</a>	312	.....	360
<a href="#">DQ872449</a>	312	.....	371
<a href="#">DQ872447</a>	328	.....	371
<a href="#">AM292655</a>	358	.....	387
		.....	417

<a href="#">AM293004</a>	354	.....	413
<a href="#">AM293002</a>	361	.....	420
<a href="#">AM292996</a>	354	.....	413
<a href="#">AM292621</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ643066</a>	361	.....	420
<a href="#">DQ499996</a>	328	.....	387
<a href="#">DQ420188</a>	360	.....	419
<a href="#">DQ420180</a>	353	.....	412
<a href="#">DQ420177</a>	358	.....	417
<a href="#">DQ420173</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ420171</a>	360	.....	419
<a href="#">DQ451097</a>	414	.....	473
<a href="#">DQ279754</a>	340	.....	399
<a href="#">DQ232748</a>	346	.....	405
<a href="#">AY822613</a>	356	.....	415
<a href="#">AB242674</a>	319	.....	378
<a href="#">DQ118033</a>	332	.....	391
<a href="#">AB159758</a>	265	.....	324
<a href="#">AB159755</a>	263	.....	322
<a href="#">DQ083478</a>	363	.....	422
<a href="#">DQ083477</a>	357	.....	416
<a href="#">AB167231</a>	336	.....	395
<a href="#">AB167230</a>	326	.....	385
<a href="#">AB167228</a>	336	.....	395
<a href="#">AB167226</a>	326	.....	385
<a href="#">AY999030</a>	314	.....	373
<a href="#">AY907676</a>	361	.....	420
<a href="#">DQ299211</a>	359	.....	418
<a href="#">DQ286360</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ286321</a>	310	.....	369
<a href="#">DQ286320</a>	328	.....	387
<a href="#">DQ286318</a>	340	.....	399
<a href="#">DQ286317</a>	334	.....	393
<a href="#">DQ286316</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ286315</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ286314</a>	328	.....	387
<a href="#">DQ286313</a>	325	.....	384
<a href="#">DQ286312</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ286311</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ286309</a>	319	.....	378
<a href="#">DQ286299</a>	338	.....	397
<a href="#">DQ286298</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ286297</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ286296</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ286295</a>	332	.....	391
<b>34a1*</b>	121	TGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTA-CCTTATTAGAA	179
<a href="#">EF072549</a>	391	.....	449
<a href="#">EU563231</a>	418	.....	476
<a href="#">EU168418</a>	370	.....	428
<a href="#">EU445339</a>	386	.....	444
<a href="#">DQ416784</a>	443	.....	501
<a href="#">CP000817</a>	10541	.....	10599
<a href="#">CP000817</a>	17258	.....	17316
<a href="#">CP000817</a>	49683	.....	49741
<a href="#">CP000817</a>	109681	.....	109739
<a href="#">CP000817</a>	222649	.....	222707
<a href="#">CP000817</a>	645016	.....	645074
<a href="#">CP000817</a>	940307	.....	940365
<a href="#">CP000817</a>	4432687	.....	4432629
<a href="#">CP000817</a>	358199	.....C.....	358258
<a href="#">CP000817</a>	759158	.....--.....	759215
<a href="#">AM934694</a>	367	.....	425
<a href="#">AB245423</a>	421	.....	479
<a href="#">AB244482</a>	421	.....	479
<a href="#">AB330401</a>	421	.....	479
<a href="#">AB330399</a>	421	.....	479
<a href="#">AB330396</a>	421	.....	479
<a href="#">AB330394</a>	421	.....	479
<a href="#">EU304958</a>	349	.....	407
<a href="#">EU304957</a>	349	.....	407
<a href="#">DQ826583</a>	430	.....	488

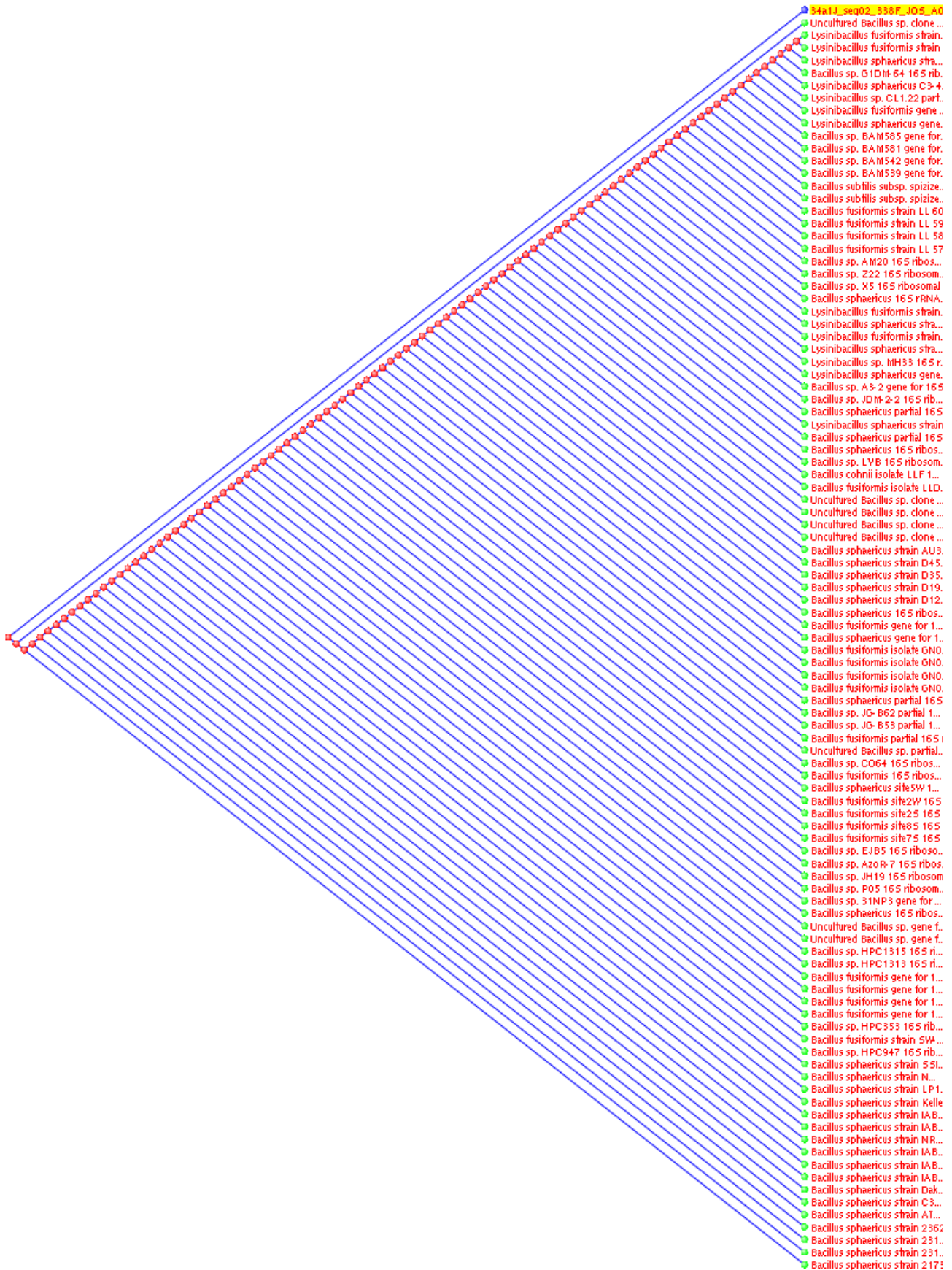
<a href="#">DQ826582</a>	430	.....-	488
<a href="#">DQ826581</a>	443	.....-	501
<a href="#">DQ826580</a>	430	.....-	488
<a href="#">EU252508</a>	433	.....-	491
<a href="#">EU236749</a>	419	.....-	477
<a href="#">EU236728</a>	421	.....-	479
<a href="#">AM903104</a>	418	.....-	476
<a href="#">EU187498</a>	408	.....-	466
<a href="#">EU187497</a>	400	.....-	458
<a href="#">EU187493</a>	415	.....-	473
<a href="#">EU187490</a>	407	.....-	465
<a href="#">EU182861</a>	380	.....-	438
<a href="#">AB363739</a>	421	.....-	479
<a href="#">AB244290</a>	421	.....-	479
<a href="#">EF584540</a>	420	.....-	478
<a href="#">AM269451</a>	394	.....-	452
<a href="#">EF563985</a>	366	.....-	424
<a href="#">AM493669</a>	231	.....-	289
<a href="#">EF101920</a>	371	.....-	429
<a href="#">EF188283</a>	414	.....-	472
<a href="#">DQ333290</a>	445	.....-	503
<a href="#">DQ333288</a>	431	.....-	489
<a href="#">EF074984</a>	394	.....-	452
<a href="#">EF074654</a>	394	.....-	452
<a href="#">EF074595</a>	395	.....-	453
<a href="#">EF074475</a>	395	.....-	453
<a href="#">EF032669</a>	442	.....-	500
<a href="#">DQ923492</a>	397	.....-	455
<a href="#">DQ923491</a>	393	.....-	451
<a href="#">DQ923485</a>	372	.....-	430
<a href="#">DQ923481</a>	406	.....-	464
<a href="#">DQ916139</a>	403	.....-	461
<a href="#">AB271743</a>	421	.....-	479
<a href="#">AB271742</a>	421	.....-	479
<a href="#">DQ872451</a>	361	.....-	419
<a href="#">DQ872450</a>	372	.....-	430
<a href="#">DQ872449</a>	372	.....-	430
<a href="#">DQ872447</a>	388	.....-	446
<a href="#">AM292655</a>	418	.....-	476
<a href="#">AM293004</a>	414	.....-	472
<a href="#">AM293002</a>	421	.....-	479
<a href="#">AM292996</a>	414	.....-	472
<a href="#">AM292621</a>	386	.....-	444
<a href="#">DQ643066</a>	421	.....-	479
<a href="#">DQ499996</a>	388	.....-	446
<a href="#">DQ420188</a>	420	.....-	478
<a href="#">DQ420180</a>	413	.....-	471
<a href="#">DQ420177</a>	418	.....-	476
<a href="#">DQ420173</a>	391	.....-	449
<a href="#">DQ420171</a>	420	.....-	478
<a href="#">DQ451097</a>	474	.....-	532
<a href="#">DQ279754</a>	400	.....-	458
<a href="#">DQ232748</a>	406	.....-	464
<a href="#">AY822613</a>	416	.....-	474
<a href="#">AB242674</a>	379	.....-	437
<a href="#">DQ118033</a>	392	.....-	450
<a href="#">AB159758</a>	325	.....-	383
<a href="#">AB159755</a>	323	.....-	381
<a href="#">DQ083478</a>	423	.....-	481
<a href="#">DQ083477</a>	417	.....-	475
<a href="#">AB167231</a>	396	.....-	454
<a href="#">AB167230</a>	386	.....-	444
<a href="#">AB167228</a>	396	.....-	454
<a href="#">AB167226</a>	386	.....-	444
<a href="#">AY999030</a>	374	.....-	432
<a href="#">AY907676</a>	421	.....-	479
<a href="#">DQ299211</a>	419	.....-	477
<a href="#">DQ286360</a>	391	.....-	449
<a href="#">DQ286321</a>	370	.....-	428
<a href="#">DQ286320</a>	388	.....-	446
<a href="#">DQ286318</a>	400	.....-	458
<a href="#">DQ286317</a>	394	.....-	452



<a href="#">DQ286316</a>	386	.....-	444
<a href="#">DQ286315</a>	391	.....-	449
<a href="#">DQ286314</a>	388	.....-	446
<a href="#">DQ286313</a>	385	.....-	443
<a href="#">DQ286312</a>	393	.....-	451
<a href="#">DQ286311</a>	386	.....-	444
<a href="#">DQ286309</a>	379	.....-	437
<a href="#">DQ286299</a>	398	.....-	456
<a href="#">DQ286298</a>	391	.....-	449
<a href="#">DQ286297</a>	393	.....-	451
<a href="#">DQ286296</a>	393	.....-	451
<a href="#">DQ286295</a>	392	.....-	450

<b>34a1*</b>	180	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT	232
<a href="#">EF072549</a>	450	.....T...TG.....	502
<a href="#">EU563231</a>	477	.....T...TG.....	529
<a href="#">EU168418</a>	429	.....T...TG.....	481
<a href="#">EU445339</a>	445	.....T...TG.....	497
<a href="#">DQ416784</a>	502	.....T...TG.....	554
<a href="#">CP000817</a>	10600	.....T...TG.....	10652
<a href="#">CP000817</a>	17317	.....T...TG.....	17369
<a href="#">CP000817</a>	49742	.....T...TG.....	49794
<a href="#">CP000817</a>	109740	.....T...TG.....	109792
<a href="#">CP000817</a>	222708	.....T...TG.....	222760
<a href="#">CP000817</a>	645075	.....T...TG.....	645127
<a href="#">CP000817</a>	940366	.....T...TG.....	940418
<a href="#">CP000817</a>	4432628	.....T...TG.....	4432576
<a href="#">CP000817</a>	358259	.....T...TG.....	358311
<a href="#">CP000817</a>	759216	.....T...TG.....	759268
<a href="#">AM934694</a>	426	.....T...TG.....	478
<a href="#">AB245423</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB244482</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330401</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330399</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330396</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330394</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">EU304958</a>	408	.....T...TG.....	460
<a href="#">EU304957</a>	408	.....T...TG.....	460
<a href="#">DQ826583</a>	489	.....T...TG.....	541
<a href="#">DQ826582</a>	489	.....T...TG.....	541
<a href="#">DQ826581</a>	502	.....T...TG.....	554
<a href="#">DQ826580</a>	489	.....T...TG.....	541
<a href="#">EU252508</a>	492	.....T...TG.....	544
<a href="#">EU236749</a>	478	.....T...TG.....	530
<a href="#">EU236728</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AM903104</a>	477	.....T...TG.....	529
<a href="#">EU187498</a>	467	.....T...TG.....	519
<a href="#">EU187497</a>	459	.....T...TG.....	511
<a href="#">EU187493</a>	474	.....T...TG.....	526
<a href="#">EU187490</a>	466	.....T...TG.....	518
<a href="#">EU182861</a>	439	.....T...TG.....	491
<a href="#">AB363739</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB244290</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">EF584540</a>	479	.....T...TG.....	531
<a href="#">AM269451</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF563985</a>	425	.....T...TG.....	477
<a href="#">AM493669</a>	290	.....T...TG.....	342
<a href="#">EF101920</a>	430	.....T...TG.....	482
<a href="#">EF188283</a>	473	.....T...TG.....	525
<a href="#">DQ333290</a>	504	.....T...TG.....	556
<a href="#">DQ333288</a>	490	.....T...TG.....	542
<a href="#">EF074984</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF074654</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF074595</a>	454	.....T...TG.....	506
<a href="#">EF074475</a>	454	.....T...TG.....	506
<a href="#">EF032669</a>	501	.....T...TG.....	553
<a href="#">DQ923492</a>	456	.....T...TG.....	508
<a href="#">DQ923491</a>	452	.....T...TG.....	504
<a href="#">DQ923485</a>	431	.....T...TG.....	483
<a href="#">DQ923481</a>	465	.....T...TG.....	517
<a href="#">DQ916139</a>	462	.....T...TG.....	514
<a href="#">AB271743</a>	480	.....T...TG.....	532

<a href="#">AB271742</a>	480	.....	T...TG.....	532
<a href="#">DQ872451</a>	420	.....	T...TG.....	472
<a href="#">DQ872450</a>	431	.....	T...TG.....	483
<a href="#">DQ872449</a>	431	.....	T...TG.....	483
<a href="#">DQ872447</a>	447	.....	T...TG.....	499
<a href="#">AM292655</a>	477	.....	T...TG.....	529
<a href="#">AM293004</a>	473	.....	T...TG.....	525
<a href="#">AM293002</a>	480	.....	T...TG.....	532
<a href="#">AM292996</a>	473	.....	T...TG.....	525
<a href="#">AM292621</a>	445	.....	T...TG.....	497
<a href="#">DQ643066</a>	480	.....	T...TG.....	532
<a href="#">DQ499996</a>	447	.....	T...TG.....	499
<a href="#">DQ420188</a>	479	.....	T...TG.....	531
<a href="#">DQ420180</a>	472	.....	T...TG.....	524
<a href="#">DQ420177</a>	477	.....	T...TG.....	529
<a href="#">DQ420173</a>	450	.....	T...TG.....	502
<a href="#">DQ420171</a>	479	.....	T...TG.....	531
<a href="#">DQ451097</a>	533	.....	T...TG.....	585
<a href="#">DQ279754</a>	459	.....	T...TG.....	511
<a href="#">DQ232748</a>	465	.....	T...TG.....	517
<a href="#">AY822613</a>	475	.....	T...TG.....	527
<a href="#">AB242674</a>	438	.....	T...TG.....	490
<a href="#">DQ118033</a>	451	.....	T...TG.....	503
<a href="#">AB159758</a>	384	.....	T...TG.....	436
<a href="#">AB159755</a>	382	.....	T...TG.....	434
<a href="#">DQ083478</a>	482	.....	T...TG.....	534
<a href="#">DQ083477</a>	476	.....	T...TG.....	528
<a href="#">AB167231</a>	455	.....	T...TG.....	507
<a href="#">AB167230</a>	445	.....	T...TG.....	497
<a href="#">AB167228</a>	455	.....	T...TG.....	507
<a href="#">AB167226</a>	445	.....	T...TG.....	497
<a href="#">AY999030</a>	433	.....	T...TG.....	485
<a href="#">AY907676</a>	480	.....	T...TG.....	532
<a href="#">DQ299211</a>	478	.....	T...TG.....	530
<a href="#">DQ286360</a>	450	.....	T...TG.....	502
<a href="#">DQ286321</a>	429	.....	T...TG.....	481
<a href="#">DQ286320</a>	447	.....	T...TG.....	499
<a href="#">DQ286318</a>	459	.....	T...TG.....	511
<a href="#">DQ286317</a>	453	.....	T...TG.....	505
<a href="#">DQ286316</a>	445	.....	T...TG.....	497
<a href="#">DQ286315</a>	450	.....	T...TG.....	502
<a href="#">DQ286314</a>	447	.....	T...TG.....	499
<a href="#">DQ286313</a>	444	.....	T...TG.....	496
<a href="#">DQ286312</a>	452	.....	T...TG.....	504
<a href="#">DQ286311</a>	445	.....	T...TG.....	497
<a href="#">DQ286309</a>	438	.....	T...TG.....	490
<a href="#">DQ286299</a>	457	.....	T...TG.....	509
<a href="#">DQ286298</a>	450	.....	T...TG.....	502
<a href="#">DQ286297</a>	452	.....	T...TG.....	504
<a href="#">DQ286296</a>	452	.....	T...TG.....	504
<a href="#">DQ286295</a>	451	.....	T...TG.....	503



**Primer: 338F**

**Amostra: 338F - 34a1F (poucas diferenças) igual ao 531R - 34a1A, 34a1C, 34a1D, 34a1G, 34a1H, 34a1M, 34a1S, 34a1T**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF074519.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1S2_G03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">394</a>	394	81%	6e-109	97%
<a href="#">DQ993298.1</a>	Bacillus sp. MHS024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">385</a>	385	81%	3e-106	96%
<a href="#">EU029242.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone B115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">381</a>	381	81%	4e-105	96%
<a href="#">EF072549.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WA2S1_B09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">378</a>	378	81%	5e-104	96%
<a href="#">EU563231.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain 12170500 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB362284.1</a>	Bacillus sp. JAM-FM1901 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU168418.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain IBL10B1445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU445339.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain PBCC2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ416784.1</a>	Bacillus sp. G1DM-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">CP000817.1</a>	Lysinibacillus sphaericus C3-41, complete genome	<a href="#">376</a>	3751	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM934694.1</a>	Lysinibacillus sp. CL1.22 partial 16S rRNA gene, strain CL1.22	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM934693.1</a>	Bacillus sp. CL1.8 partial 16S rRNA gene, strain CL1.8	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB245423.1</a>	Lysinibacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB244482.1</a>	Lysinibacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: limp 5-1	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB330401.1</a>	Bacillus sp. BAM585 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB330399.1</a>	Bacillus sp. BAM581 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB330396.1</a>	Bacillus sp. BAM542 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB330394.1</a>	Bacillus sp. BAM539 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU304958.1</a>	Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain 3EC5C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU304957.1</a>	Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain 3EC5C2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ826583.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ826582.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ826581.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ826580.1</a>	Bacillus fusiformis strain LL 57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU252508.1</a>	Bacillus sp. AM20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU249562.1</a>	Bacillus silvestris strain TPBF15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU236749.1</a>	Bacillus sp. Z22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU236728.1</a>	Bacillus sp. X5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF114311.2</a>	Bacillus sp. B3W22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM903104.1</a>	Bacillus sphaericus 16S rRNA gene, isolate JG-7B	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU187498.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain X-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU187497.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain X-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU187493.1</a>	Lysinibacillus fusiformis strain X-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU187490.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain X-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EU182861.1</a>	Lysinibacillus sp. MH33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB363739.1</a>	Lysinibacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3525	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB244290.1</a>	Bacillus sp. A3-2 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: A3-2	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM773821.1</a>	Bacillus bhargavae 16S rRNA gene	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF584540.1</a>	Bacillus sp. JDM-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM269451.1</a>	Bacillus sphaericus partial 16S rRNA gene, isolate BS11	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF563985.1</a>	Lysinibacillus sphaericus strain G.C. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM493669.1</a>	Bacillus sphaericus partial 16S rRNA gene	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF101920.1</a>	Bacillus sphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF188283.1</a>	Bacillus sp. LYB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ333290.1</a>	Bacillus cohnii isolate LLF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ333288.1</a>	Bacillus fusiformis isolate LLD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF075367.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2W3_E01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF075319.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2W3_H07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF075052.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2S3_H08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF074984.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC2S2_C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF074654.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1W1_E02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF074595.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1S3_E07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF074475.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1S2_C03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">EF032669.1</a>	Bacillus sphaericus strain AU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ923492.1</a>	Bacillus sphaericus strain D45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ923491.1</a>	Bacillus sphaericus strain D35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ923485.1</a>	Bacillus sphaericus strain D19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ923481.1</a>	Bacillus sphaericus strain D12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ916139.1</a>	Bacillus sphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB271743.1</a>	Bacillus fusiformis gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB271742.1</a>	Bacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ872451.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9h 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ872450.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9f 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ872449.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ872447.1</a>	Bacillus fusiformis isolate GN04-9c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM292655.1</a>	Bacillus sphaericus partial 16S rRNA gene, strain JG-A12	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM293004.1</a>	Bacillus sp. JG-B62 partial 16S rRNA gene, isolate JG-B62	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM293002.1</a>	Bacillus sp. JG-B53 partial 16S rRNA gene, isolate JG-B53	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM292996.1</a>	Bacillus fusiformis partial 16S rRNA gene, isolate JG-B7	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AM292621.1</a>	Uncultured Bacillus sp. partial 16S rRNA gene, clone JG35-U4-KF48	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ643066.1</a>	Bacillus sp. CO64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ499996.1</a>	Bacillus fusiformis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ420188.1</a>	Bacillus sphaericus site5W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ420180.1</a>	Bacillus fusiformis site2W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ420177.1</a>	Bacillus fusiformis site2S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ420173.1</a>	Bacillus fusiformis site8S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ420171.1</a>	Bacillus fusiformis site7S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ451097.1</a>	Bacillus sp. EJB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ279754.1</a>	Bacillus sp. AzoR-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ232748.1</a>	Bacillus sp. JH19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">AB242674.1</a>	Bacillus sp. 31NP3 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ118033.1</a>	Bacillus sphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ083478.1</a>	Bacillus sp. HPC1315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286360.1</a>	Bacillus sphaericus strain SSII-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286321.1</a>	Bacillus sphaericus strain NRS1184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286320.1</a>	Bacillus sphaericus strain LP1-G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286318.1</a>	Bacillus sphaericus strain KellenQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286317.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB881 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286316.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB872 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286315.1</a>	Bacillus sphaericus strain NRS1693 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286314.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB769 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286313.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB763 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286312.1</a>	Bacillus sphaericus strain IAB59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286311.1</a>	Bacillus sphaericus strain Dak614 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286309.1</a>	Bacillus sphaericus strain C3-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286299.1</a>	Bacillus sphaericus strain ATCC 14577 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286298.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2362 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286297.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2317-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286296.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2314-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%
<a href="#">DQ286295.1</a>	Bacillus sphaericus strain 2173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">376</a>	376	81%	2e-103	96%

<b>34a1*</b>	1	AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGATGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGC	60
<a href="#">EF074519</a>	275	.....C.....G.....	333
<a href="#">DQ993298</a>	279	.....C.....G.....	337
<a href="#">EU029242</a>	267	.....C.....G.....A.	325
<a href="#">EF072549</a>	271	.....C.....G.....	330
<a href="#">EU563231</a>	299	.....C.....G.....	357
<a href="#">AB362284</a>	246	.....C.....G.....A.	304
<a href="#">EU168418</a>	251	.....C.....G.....	309
<a href="#">EU445339</a>	267	.....C.....G.....	325
<a href="#">DQ416784</a>	324	.....C.....G.....	382
<a href="#">CP000817</a>	10422	.....C.....G.....	10480
<a href="#">CP000817</a>	17139	.....C.....G.....	17197
<a href="#">CP000817</a>	49564	.....C.....G.....	49622
<a href="#">CP000817</a>	109562	.....C.....G.....	109620
<a href="#">CP000817</a>	222530	.....C.....G.....	222588
<a href="#">CP000817</a>	644897	.....C.....G.....	644955
<a href="#">CP000817</a>	940188	.....C.....G.....	940246
<a href="#">CP000817</a>	4432806	.....C.....G.....	4432748
<a href="#">CP000817</a>	358080	.....C.....G.....	358138
<a href="#">CP000817</a>	759039	.....C.....G.....	759097
<a href="#">AM934694</a>	248	.....C.....G.....	306
<a href="#">AM934693</a>	317	.....C.....G.....A.	375
<a href="#">AB245423</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB244482</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB330401</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB330399</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB330396</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB330394</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">EU304958</a>	230	.....C.....G.....	288
<a href="#">EU304957</a>	230	.....C.....G.....	288
<a href="#">DQ826583</a>	311	.....C.....G.....	369
<a href="#">DQ826582</a>	311	.....C.....G.....	369
<a href="#">DQ826581</a>	324	.....C.....G.....	382
<a href="#">DQ826580</a>	311	.....C.....G.....	369
<a href="#">EU252508</a>	314	.....C.....G.....	372
<a href="#">EU249562</a>	221	.....C.....G.....A.	279
<a href="#">EU236749</a>	300	.....C.....G.....	358
<a href="#">EU236728</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">EF114311</a>	324	.....C.....G.....A.	382
<a href="#">AM903104</a>	299	.....C.....G.....	357
<a href="#">EU187498</a>	289	.....C.....G.....	347
<a href="#">EU187497</a>	281	.....C.....G.....	339
<a href="#">EU187493</a>	296	.....C.....G.....	354
<a href="#">EU187490</a>	288	.....C.....G.....	346
<a href="#">EU182861</a>	261	.....C.....G.....	319
<a href="#">AB363739</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB244290</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AM773821</a>	323	.....C.....G.....A.	381
<a href="#">EF584540</a>	301	.....C.....G.....	359
<a href="#">AM269451</a>	275	.....C.....G.....	333
<a href="#">EF563985</a>	247	.....C.....G.....	305
<a href="#">AM493669</a>	112	.....C.....G.....	170
<a href="#">EF101920</a>	252	.....C.....G.....	310
<a href="#">EF188283</a>	295	.....C.....G.....	353
<a href="#">DQ333290</a>	326	.....C.....G.....	384
<a href="#">DQ333288</a>	312	.....C.....G.....	370
<a href="#">EF075367</a>	276	.....C.....G.....A.	334
<a href="#">EF075319</a>	277	.....C.....G.....A.	335
<a href="#">EF075052</a>	275	.....C.....G.....A.	333
<a href="#">EF074984</a>	275	.....C.....G.....	333
<a href="#">EF074654</a>	275	.....C.....G.....	333
<a href="#">EF074595</a>	276	.....C.....G.....	334
<a href="#">EF074475</a>	276	.....C.....G.....	334
<a href="#">EF032669</a>	323	.....C.....G.....	381
<a href="#">DQ923492</a>	278	.....C.....G.....	336
<a href="#">DQ923491</a>	274	.....C.....G.....	332
<a href="#">DQ923485</a>	253	.....C.....G.....	311
<a href="#">DQ923481</a>	287	.....C.....G.....	345
<a href="#">DQ916139</a>	284	.....C.....G.....	342
<a href="#">AB271743</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AB271742</a>	302	.....C.....G.....	360

<a href="#">DQ872451</a>	242	.....C.....G.....	300
<a href="#">DQ872450</a>	253	.....C.....G.....	311
<a href="#">DQ872449</a>	253	.....C.....G.....	311
<a href="#">DQ872447</a>	269	.....C.....G.....	327
<a href="#">AM292655</a>	299	.....C.....G.....	357
<a href="#">AM293004</a>	295	.....C.....G.....	353
<a href="#">AM293002</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">AM292996</a>	295	.....C.....G.....	353
<a href="#">AM292621</a>	267	.....C.....G.....	325
<a href="#">DQ643066</a>	302	.....C.....G.....	360
<a href="#">DQ499996</a>	269	.....C.....G.....	327
<a href="#">DQ420188</a>	301	.....C.....G.....	359
<a href="#">DQ420180</a>	294	.....C.....G.....	352
<a href="#">DQ420177</a>	299	.....C.....G.....	357
<a href="#">DQ420173</a>	272	.....C.....G.....	330
<a href="#">DQ420171</a>	301	.....C.....G.....	359
<a href="#">DQ451097</a>	355	.....C.....G.....	413
<a href="#">DQ279754</a>	281	.....C.....G.....	339
<a href="#">DQ232748</a>	287	.....C.....G.....	345
<a href="#">AB242674</a>	260	.....C.....G.....	318
<a href="#">DQ118033</a>	273	.....C.....G.....	331
<a href="#">DQ083478</a>	304	.....C.....G.....	362
<a href="#">DQ286360</a>	272	.....C.....G.....	330
<a href="#">DQ286321</a>	251	.....C.....G.....	309
<a href="#">DQ286320</a>	269	.....C.....G.....	327
<a href="#">DQ286318</a>	281	.....C.....G.....	339
<a href="#">DQ286317</a>	275	.....C.....G.....	333
<a href="#">DQ286316</a>	267	.....C.....G.....	325
<a href="#">DQ286315</a>	272	.....C.....G.....	330
<a href="#">DQ286314</a>	269	.....C.....G.....	327
<a href="#">DQ286313</a>	266	.....C.....G.....	324
<a href="#">DQ286312</a>	274	.....C.....G.....	332
<a href="#">DQ286311</a>	267	.....C.....G.....	325
<a href="#">DQ286309</a>	260	.....C.....G.....	318
<a href="#">DQ286299</a>	279	.....C.....G.....	337
<a href="#">DQ286298</a>	272	.....C.....G.....	330
<a href="#">DQ286297</a>	274	.....C.....G.....	332
<a href="#">DQ286296</a>	274	.....C.....G.....	332
<a href="#">DQ286295</a>	273	.....C.....G.....	331
<b>34a1*</b>	61	GAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGTGAAGAAGGATTTCGGTTCGTAAACTCTGT	120
<a href="#">EF074519</a>	334	.....	393
<a href="#">DQ993298</a>	338	.....	397
<a href="#">EU029242</a>	326	.....T.....	385
<a href="#">EF072549</a>	331	.....	390
<a href="#">EU563231</a>	358	.....	417
<a href="#">AB362284</a>	305	.....T.....	364
<a href="#">EU168418</a>	310	.....	369
<a href="#">EU445339</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ416784</a>	383	.....	442
<a href="#">CP000817</a>	10481	.....	10540
<a href="#">CP000817</a>	17198	.....	17257
<a href="#">CP000817</a>	49623	.....	49682
<a href="#">CP000817</a>	109621	.....	109680
<a href="#">CP000817</a>	222589	.....	222648
<a href="#">CP000817</a>	644956	.....	645015
<a href="#">CP000817</a>	940247	.....	940306
<a href="#">CP000817</a>	4432747	.....	4432688
<a href="#">CP000817</a>	358139	.....	358198
<a href="#">CP000817</a>	759098	.....	759157
<a href="#">AM934694</a>	307	.....	366
<a href="#">AM934693</a>	376	.....T.....	435
<a href="#">AB245423</a>	361	.....	420
<a href="#">AB244482</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330401</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330399</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330396</a>	361	.....	420
<a href="#">AB330394</a>	361	.....	420
<a href="#">EU304958</a>	289	.....	348
<a href="#">EU304957</a>	289	.....	348
<a href="#">DQ826583</a>	370	.....	429
<a href="#">DQ826582</a>	370	.....	429

<a href="#">DQ826581</a>	383	.....	442
<a href="#">DQ826580</a>	370	.....	429
<a href="#">EU252508</a>	373	.....	432
<a href="#">EU249562</a>	280	..... T .....	339
<a href="#">EU236749</a>	359	.....	418
<a href="#">EU236728</a>	361	.....	420
<a href="#">EF114311</a>	383	..... T .....	442
<a href="#">AM903104</a>	358	.....	417
<a href="#">EU187498</a>	348	.....	407
<a href="#">EU187497</a>	340	.....	399
<a href="#">EU187493</a>	355	.....	414
<a href="#">EU187490</a>	347	.....	406
<a href="#">EU182861</a>	320	.....	379
<a href="#">AB363739</a>	361	.....	420
<a href="#">AB244290</a>	361	.....	420
<a href="#">AM773821</a>	382	..... T .....	441
<a href="#">EF584540</a>	360	.....	419
<a href="#">AM269451</a>	334	.....	393
<a href="#">EF563985</a>	306	.....	365
<a href="#">AM493669</a>	171	.....	230
<a href="#">EF101920</a>	311	.....	370
<a href="#">EF188283</a>	354	.....	413
<a href="#">DQ333290</a>	385	.....	444
<a href="#">DQ333288</a>	371	.....	430
<a href="#">EF075367</a>	335	..... T .....	394
<a href="#">EF075319</a>	336	..... T .....	395
<a href="#">EF075052</a>	334	..... T .....	393
<a href="#">EF074984</a>	334	.....	393
<a href="#">EF074654</a>	334	.....	393
<a href="#">EF074595</a>	335	.....	394
<a href="#">EF074475</a>	335	.....	394
<a href="#">EF032669</a>	382	.....	441
<a href="#">DQ923492</a>	337	.....	396
<a href="#">DQ923491</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ923485</a>	312	.....	371
<a href="#">DQ923481</a>	346	.....	405
<a href="#">DQ916139</a>	343	.....	402
<a href="#">AB271743</a>	361	.....	420
<a href="#">AB271742</a>	361	.....	420
<a href="#">DQ872451</a>	301	.....	360
<a href="#">DQ872450</a>	312	.....	371
<a href="#">DQ872449</a>	312	.....	371
<a href="#">DQ872447</a>	328	.....	387
<a href="#">AM292655</a>	358	.....	417
<a href="#">AM293004</a>	354	.....	413
<a href="#">AM293002</a>	361	.....	420
<a href="#">AM292996</a>	354	.....	413
<a href="#">AM292621</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ643066</a>	361	.....	420
<a href="#">DQ499996</a>	328	.....	387
<a href="#">DQ420188</a>	360	.....	419
<a href="#">DQ420180</a>	353	.....	412
<a href="#">DQ420177</a>	358	.....	417
<a href="#">DQ420173</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ420171</a>	360	.....	419
<a href="#">DQ451097</a>	414	.....	473
<a href="#">DQ279754</a>	340	.....	399
<a href="#">DQ232748</a>	346	.....	405
<a href="#">AB242674</a>	319	.....	378
<a href="#">DQ118033</a>	332	.....	391
<a href="#">DQ083478</a>	363	.....	422
<a href="#">DQ286360</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ286321</a>	310	.....	369
<a href="#">DQ286320</a>	328	.....	387
<a href="#">DQ286318</a>	340	.....	399
<a href="#">DQ286317</a>	334	.....	393
<a href="#">DQ286316</a>	326	.....	385
<a href="#">DQ286315</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ286314</a>	328	.....	387
<a href="#">DQ286313</a>	325	.....	384
<a href="#">DQ286312</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ286311</a>	326	.....	385

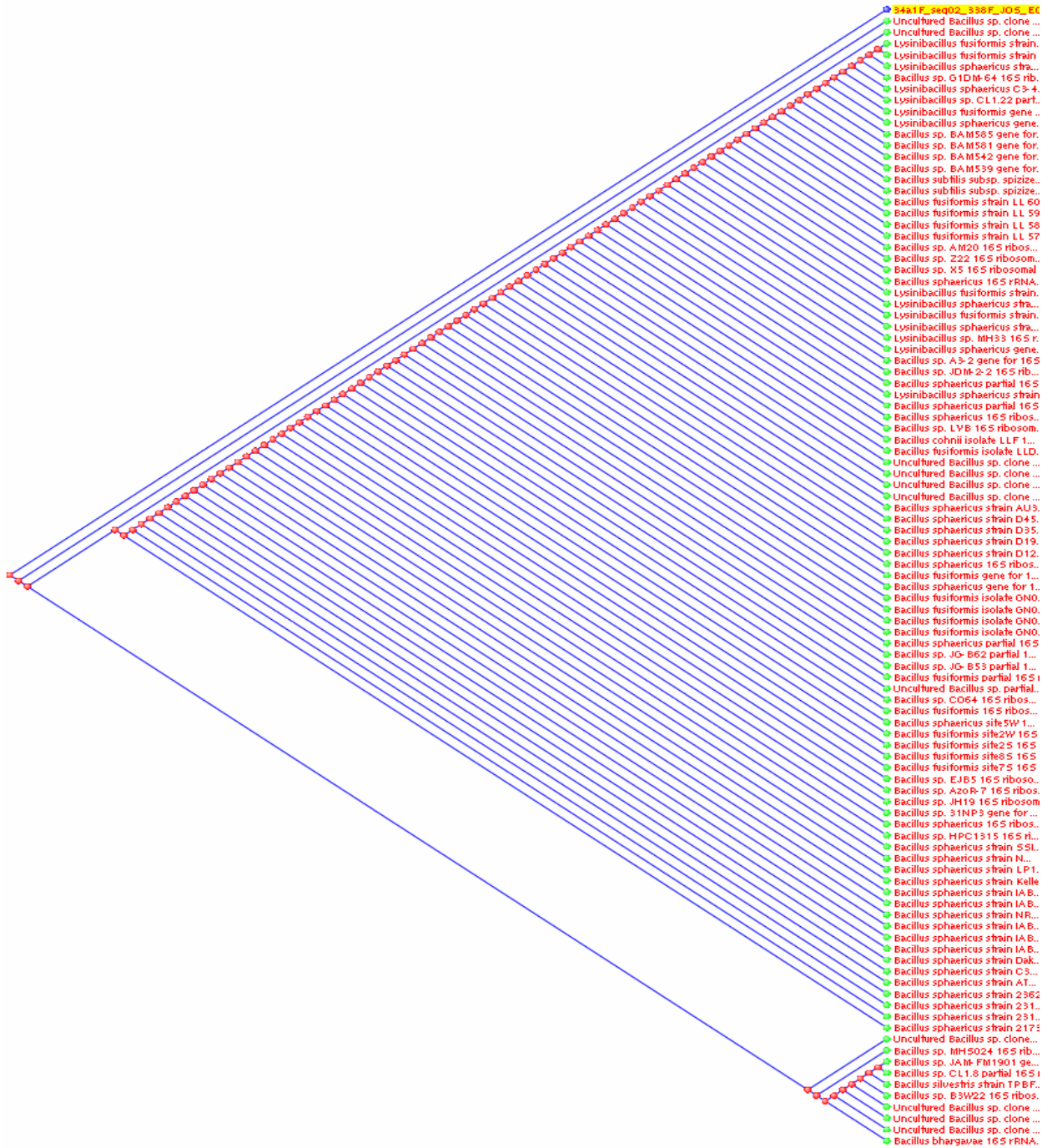


<a href="#">DQ286309</a>	319	.....	378
<a href="#">DQ286299</a>	338	.....	397
<a href="#">DQ286298</a>	331	.....	390
<a href="#">DQ286297</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ286296</a>	333	.....	392
<a href="#">DQ286295</a>	332	.....	391
<b>34a1*</b>	121	TGTAAGGGAAGAACAAGTAGCGTAGTAACTGGCGCTACCTTGACGGTA-CCTTATTAGAA	179
<a href="#">EF074519</a>	394	.....	452
<a href="#">DQ993298</a>	398	.C.....G.....	456
<a href="#">EU029242</a>	386	.....T.....	444
<a href="#">EF072549</a>	391	.....CA.....TG.....	449
<a href="#">EU563231</a>	418	.....CA.....TG.....	476
<a href="#">AB362284</a>	365	.C.....G.....	423
<a href="#">EU168418</a>	370	.....CA.....TG.....	428
<a href="#">EU445339</a>	386	.....CA.....TG.....	444
<a href="#">DQ416784</a>	443	.....CA.....TG.....	501
<a href="#">CP000817</a>	10541	.....CA.....TG.....	10599
<a href="#">CP000817</a>	17258	.....CA.....TG.....	17316
<a href="#">CP000817</a>	49683	.....CA.....TG.....	49741
<a href="#">CP000817</a>	109681	.....CA.....TG.....	109739
<a href="#">CP000817</a>	222649	.....CA.....TG.....	222707
<a href="#">CP000817</a>	645016	.....CA.....TG.....	645074
<a href="#">CP000817</a>	940307	.....CA.....TG.....	940365
<a href="#">CP000817</a>	4432687	.....CA.....TG.....	4432629
<a href="#">CP000817</a>	358199	.....CA.....TG.....C.....	358258
<a href="#">CP000817</a>	759158	.....CA.....TG.....--.....	759215
<a href="#">AM934694</a>	367	.....CA.....TG.....	425
<a href="#">AM934693</a>	436	.C.....G.....	494
<a href="#">AB245423</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AB244482</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AB330401</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AB330399</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AB330396</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AB330394</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">EU304958</a>	349	.....CA.....TG.....	407
<a href="#">EU304957</a>	349	.....CA.....TG.....	407
<a href="#">DQ826583</a>	430	.....CA.....TG.....	488
<a href="#">DQ826582</a>	430	.....CA.....TG.....	488
<a href="#">DQ826581</a>	443	.....CA.....TG.....	501
<a href="#">DQ826580</a>	430	.....CA.....TG.....	488
<a href="#">EU252508</a>	433	.....CA.....TG.....	491
<a href="#">EU249562</a>	340	.C.....G.....	398
<a href="#">EU236749</a>	419	.....CA.....TG.....	477
<a href="#">EU236728</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">EF114311</a>	443	.C.....G.....	501
<a href="#">AM903104</a>	418	.....CA.....TG.....	476
<a href="#">EU187498</a>	408	.....CA.....TG.....	466
<a href="#">EU187497</a>	400	.....CA.....TG.....	458
<a href="#">EU187493</a>	415	.....CA.....TG.....	473
<a href="#">EU187490</a>	407	.....CA.....TG.....	465
<a href="#">EU182861</a>	380	.....CA.....TG.....	438
<a href="#">AB363739</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AB244290</a>	421	.....CA.....TG.....	479
<a href="#">AM773821</a>	442	.C.....G.....	500
<a href="#">EF584540</a>	420	.....CA.....TG.....	478
<a href="#">AM269451</a>	394	.....CA.....TG.....	452
<a href="#">EF563985</a>	366	.....CA.....TG.....	424
<a href="#">AM493669</a>	231	.....CA.....TG.....	289
<a href="#">EF101920</a>	371	.....CA.....TG.....	429
<a href="#">EF188283</a>	414	.....CA.....TG.....	472
<a href="#">DQ333290</a>	445	.....CA.....TG.....	503
<a href="#">DQ333288</a>	431	.....CA.....TG.....	489
<a href="#">EF075367</a>	395	.C.....G.....	453
<a href="#">EF075319</a>	396	.C.....G.....	454
<a href="#">EF075052</a>	394	.C.....G.....	452
<a href="#">EF074984</a>	394	.....CA.....TG.....	452
<a href="#">EF074654</a>	394	.....CA.....TG.....	452
<a href="#">EF074595</a>	395	.....CA.....TG.....	453
<a href="#">EF074475</a>	395	.....CA.....TG.....	453
<a href="#">EF032669</a>	442	.....CA.....TG.....	500
<a href="#">DQ923492</a>	397	.....CA.....TG.....	455

<a href="#">DQ923491</a>	393	.....CA.....TG.....-	451
<a href="#">DQ923485</a>	372	.....CA.....TG.....-	430
<a href="#">DQ923481</a>	406	.....CA.....TG.....-	464
<a href="#">DQ916139</a>	403	.....CA.....TG.....-	461
<a href="#">AB271743</a>	421	.....CA.....TG.....-	479
<a href="#">AB271742</a>	421	.....CA.....TG.....-	479
<a href="#">DQ872451</a>	361	.....CA.....TG.....-	419
<a href="#">DQ872450</a>	372	.....CA.....TG.....-	430
<a href="#">DQ872449</a>	372	.....CA.....TG.....-	430
<a href="#">DQ872447</a>	388	.....CA.....TG.....-	446
<a href="#">AM292655</a>	418	.....CA.....TG.....-	476
<a href="#">AM293004</a>	414	.....CA.....TG.....-	472
<a href="#">AM293002</a>	421	.....CA.....TG.....-	479
<a href="#">AM292996</a>	414	.....CA.....TG.....-	472
<a href="#">AM292621</a>	386	.....CA.....TG.....-	444
<a href="#">DQ643066</a>	421	.....CA.....TG.....-	479
<a href="#">DQ499996</a>	388	.....CA.....TG.....-	446
<a href="#">DQ420188</a>	420	.....CA.....TG.....-	478
<a href="#">DQ420180</a>	413	.....CA.....TG.....-	471
<a href="#">DQ420177</a>	418	.....CA.....TG.....-	476
<a href="#">DQ420173</a>	391	.....CA.....TG.....-	449
<a href="#">DQ420171</a>	420	.....CA.....TG.....-	478
<a href="#">DQ451097</a>	474	.....CA.....TG.....-	532
<a href="#">DQ279754</a>	400	.....CA.....TG.....-	458
<a href="#">DQ232748</a>	406	.....CA.....TG.....-	464
<a href="#">AB242674</a>	379	.....CA.....TG.....-	437
<a href="#">DQ118033</a>	392	.....CA.....TG.....-	450
<a href="#">DQ083478</a>	423	.....CA.....TG.....-	481
<a href="#">DQ286360</a>	391	.....CA.....TG.....-	449
<a href="#">DQ286321</a>	370	.....CA.....TG.....-	428
<a href="#">DQ286320</a>	388	.....CA.....TG.....-	446
<a href="#">DQ286318</a>	400	.....CA.....TG.....-	458
<a href="#">DQ286317</a>	394	.....CA.....TG.....-	452
<a href="#">DQ286316</a>	386	.....CA.....TG.....-	444
<a href="#">DQ286315</a>	391	.....CA.....TG.....-	449
<a href="#">DQ286314</a>	388	.....CA.....TG.....-	446
<a href="#">DQ286313</a>	385	.....CA.....TG.....-	443
<a href="#">DQ286312</a>	393	.....CA.....TG.....-	451
<a href="#">DQ286311</a>	386	.....CA.....TG.....-	444
<a href="#">DQ286309</a>	379	.....CA.....TG.....-	437
<a href="#">DQ286299</a>	398	.....CA.....TG.....-	456
<a href="#">DQ286298</a>	391	.....CA.....TG.....-	449
<a href="#">DQ286297</a>	393	.....CA.....TG.....-	451
<a href="#">DQ286296</a>	393	.....CA.....TG.....-	451
<a href="#">DQ286295</a>	392	.....CA.....TG.....-	450
<b>34a1*</b>	180	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT	232
<a href="#">EF074519</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">DQ993298</a>	457	.....T...TG.....	509
<a href="#">EU029242</a>	445	.....T...TG.....	497
<a href="#">EF072549</a>	450	.....T...TG.....	502
<a href="#">EU563231</a>	477	.....T...TG.....	529
<a href="#">AB362284</a>	424	.....T...TG.....	476
<a href="#">EU168418</a>	429	.....T...TG.....	481
<a href="#">EU445339</a>	445	.....T...TG.....	497
<a href="#">DQ416784</a>	502	.....T...TG.....	554
<a href="#">CP000817</a>	10600	.....T...TG.....	10652
<a href="#">CP000817</a>	17317	.....T...TG.....	17369
<a href="#">CP000817</a>	49742	.....T...TG.....	49794
<a href="#">CP000817</a>	109740	.....T...TG.....	109792
<a href="#">CP000817</a>	222708	.....T...TG.....	222760
<a href="#">CP000817</a>	645075	.....T...TG.....	645127
<a href="#">CP000817</a>	940366	.....T...TG.....	940418
<a href="#">CP000817</a>	4432628	.....T...TG.....	4432576
<a href="#">CP000817</a>	358259	.....T...TG.....	358311
<a href="#">CP000817</a>	759216	.....T...TG.....	759268
<a href="#">AM934694</a>	426	.....T...TG.....	478
<a href="#">AM934693</a>	495	.....T...TG.....	547
<a href="#">AB245423</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB244482</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330401</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330399</a>	480	.....T...TG.....	532

<a href="#">AB330396</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB330394</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">EU304958</a>	408	.....T...TG.....	460
<a href="#">EU304957</a>	408	.....T...TG.....	460
<a href="#">DQ826583</a>	489	.....T...TG.....	541
<a href="#">DQ826582</a>	489	.....T...TG.....	541
<a href="#">DQ826581</a>	502	.....T...TG.....	554
<a href="#">DQ826580</a>	489	.....T...TG.....	541
<a href="#">EU252508</a>	492	.....T...TG.....	544
<a href="#">EU249562</a>	399	.....T...TG.....	451
<a href="#">EU236749</a>	478	.....T...TG.....	530
<a href="#">EU236728</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">EF114311</a>	502	.....T...TG.....	554
<a href="#">AM903104</a>	477	.....T...TG.....	529
<a href="#">EU187498</a>	467	.....T...TG.....	519
<a href="#">EU187497</a>	459	.....T...TG.....	511
<a href="#">EU187493</a>	474	.....T...TG.....	526
<a href="#">EU187490</a>	466	.....T...TG.....	518
<a href="#">EU182861</a>	439	.....T...TG.....	491
<a href="#">AB363739</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB244290</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AM773821</a>	501	.....T...TG.....	553
<a href="#">EF584540</a>	479	.....T...TG.....	531
<a href="#">AM269451</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF563985</a>	425	.....T...TG.....	477
<a href="#">AM493669</a>	290	.....T...TG.....	342
<a href="#">EF101920</a>	430	.....T...TG.....	482
<a href="#">EF188283</a>	473	.....T...TG.....	525
<a href="#">DQ333290</a>	504	.....T...TG.....	556
<a href="#">DQ333288</a>	490	.....T...TG.....	542
<a href="#">EF075367</a>	454	.....T...TG.....	506
<a href="#">EF075319</a>	455	.....T...TG.....	507
<a href="#">EF075052</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF074984</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF074654</a>	453	.....T...TG.....	505
<a href="#">EF074595</a>	454	.....T...TG.....	506
<a href="#">EF074475</a>	454	.....T...TG.....	506
<a href="#">EF032669</a>	501	.....T...TG.....	553
<a href="#">DQ923492</a>	456	.....T...TG.....	508
<a href="#">DQ923491</a>	452	.....T...TG.....	504
<a href="#">DQ923485</a>	431	.....T...TG.....	483
<a href="#">DQ923481</a>	465	.....T...TG.....	517
<a href="#">DQ916139</a>	462	.....T...TG.....	514
<a href="#">AB271743</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AB271742</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">DQ872451</a>	420	.....T...TG.....	472
<a href="#">DQ872450</a>	431	.....T...TG.....	483
<a href="#">DQ872449</a>	431	.....T...TG.....	483
<a href="#">DQ872447</a>	447	.....T...TG.....	499
<a href="#">AM292655</a>	477	.....T...TG.....	529
<a href="#">AM293004</a>	473	.....T...TG.....	525
<a href="#">AM293002</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">AM292996</a>	473	.....T...TG.....	525
<a href="#">AM292621</a>	445	.....T...TG.....	497
<a href="#">DQ643066</a>	480	.....T...TG.....	532
<a href="#">DQ499996</a>	447	.....T...TG.....	499
<a href="#">DQ420188</a>	479	.....T...TG.....	531
<a href="#">DQ420180</a>	472	.....T...TG.....	524
<a href="#">DQ420177</a>	477	.....T...TG.....	529
<a href="#">DQ420173</a>	450	.....T...TG.....	502
<a href="#">DQ420171</a>	479	.....T...TG.....	531
<a href="#">DQ451097</a>	533	.....T...TG.....	585
<a href="#">DQ279754</a>	459	.....T...TG.....	511
<a href="#">DQ232748</a>	465	.....T...TG.....	517
<a href="#">AB242674</a>	438	.....T...TG.....	490
<a href="#">DQ118033</a>	451	.....T...TG.....	503
<a href="#">DQ083478</a>	482	.....T...TG.....	534
<a href="#">DQ286360</a>	450	.....T...TG.....	502
<a href="#">DQ286321</a>	429	.....T...TG.....	481
<a href="#">DQ286320</a>	447	.....T...TG.....	499
<a href="#">DQ286318</a>	459	.....T...TG.....	511
<a href="#">DQ286317</a>	453	.....T...TG.....	505

<a href="#">DQ286316</a>	445	.....T...TG.....	497
<a href="#">DQ286315</a>	450	.....T...TG.....	502
<a href="#">DQ286314</a>	447	.....T...TG.....	499
<a href="#">DQ286313</a>	444	.....T...TG.....	496
<a href="#">DQ286312</a>	452	.....T...TG.....	504
<a href="#">DQ286311</a>	445	.....T...TG.....	497
<a href="#">DQ286309</a>	438	.....T...TG.....	490
<a href="#">DQ286299</a>	457	.....T...TG.....	509
<a href="#">DQ286298</a>	450	.....T...TG.....	502
<a href="#">DQ286297</a>	452	.....T...TG.....	504
<a href="#">DQ286296</a>	452	.....T...TG.....	504
<a href="#">DQ286295</a>	451	.....T...TG.....	503

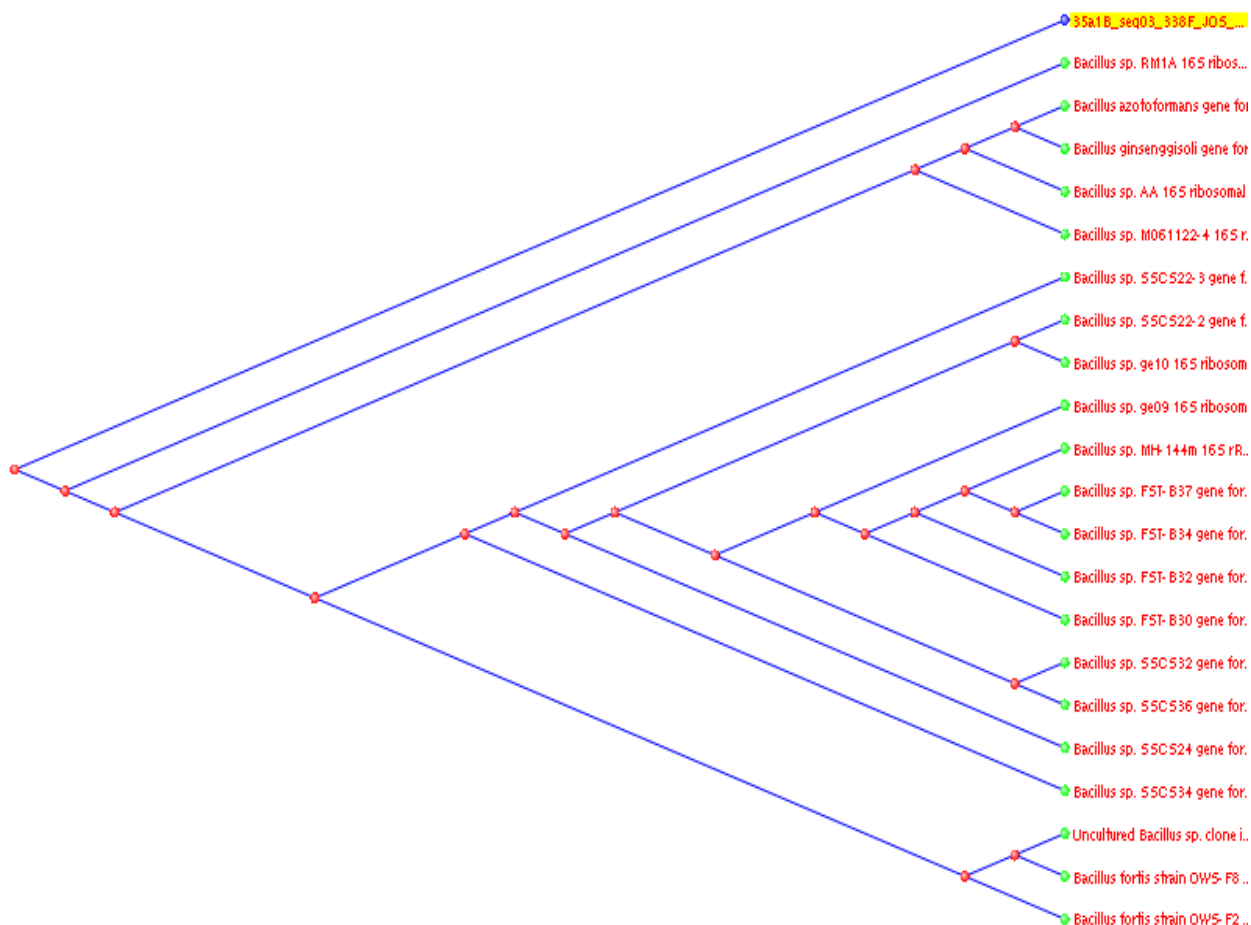


## Primer 338F

### Amostra: 35a1B

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF675626.1</a>	Bacillus sp. RM1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">379</a>	379	80%	1e-104	96%
<a href="#">AB363732.1</a>	Bacillus azotoformans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15712	<a href="#">352</a>	352	80%	2e-96	93%
<a href="#">EF081295.1</a>	Bacillus sp. AA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">352</a>	352	80%	2e-96	93%
<a href="#">EU072709.1</a>	Bacillus sp. M061122-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">351</a>	351	80%	7e-96	93%
<a href="#">EF371373.1</a>	Bacillus sp. ge09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">347</a>	347	80%	8e-95	93%
<a href="#">AB245379.1</a>	Bacillus ginsengisoli gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Gsoil 3045	<a href="#">347</a>	347	80%	8e-95	93%
<a href="#">AB211020.1</a>	Bacillus sp. SSCS22-2 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS22-2	<a href="#">347</a>	347	80%	8e-95	93%
<a href="#">AB211019.1</a>	Bacillus sp. SSCS22-3 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS22-3	<a href="#">347</a>	347	80%	8e-95	93%
<a href="#">AB211017.1</a>	Bacillus sp. SSCS24 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS24	<a href="#">347</a>	347	80%	8e-95	93%
<a href="#">AB211009.1</a>	Bacillus sp. SSCS34 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS34	<a href="#">347</a>	347	80%	8e-95	93%
<a href="#">EU175937.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone iso4_91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">EF371374.1</a>	Bacillus sp. ge10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AM423145.1</a>	Bacillus sp. MH-144m 16S rRNA gene, strain MH-144m	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AY536539.1</a>	Bacillus fortis strain OWS-F8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AY536535.1</a>	Bacillus fortis strain OWS-F2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AB211011.1</a>	Bacillus sp. SSCS32 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS32	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AB211007.1</a>	Bacillus sp. SSCS36 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS36	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AB196471.1</a>	Bacillus sp. FST-B37 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AB196470.1</a>	Bacillus sp. FST-B34 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AB196469.1</a>	Bacillus sp. FST-B32 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
<a href="#">AB196468.1</a>	Bacillus sp. FST-B30 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">343</a>	343	80%	1e-93	93%
35a1B	2	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCTGTAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG	61			
<a href="#">EF675626</a>	320	.....C.....A.C.....	379			
<a href="#">AB363732</a>	302	.....C.....A.C.....	361			
<a href="#">EF081295</a>	236	.....C.....A.C.....	295			
<a href="#">EU072709</a>	267	.....C.....A.C.....	326			
<a href="#">EF371373</a>	320	.....C.....A.C.....	379			
<a href="#">AB245379</a>	298	.....C.....A.C.....	357			
<a href="#">AB211020</a>	317	.....C.....A.C.....	376			
<a href="#">AB211019</a>	320	.....C.....A.C.....	379			
<a href="#">AB211017</a>	288	.....C.....A.C.....	347			
<a href="#">AB211009</a>	293	.....C.....A.C.....	352			
<a href="#">EU175937</a>	297	.....C.....A.C.....	356			
<a href="#">EF371374</a>	320	.....C.....A.C.....	379			
<a href="#">AM423145</a>	295	.....C.....A.C.....	354			
<a href="#">AY536539</a>	244	.....C.....A.C.....	303			
<a href="#">AY536535</a>	245	.....C.....A.C.....	304			
<a href="#">AB211011</a>	277	.....C.....A.C.....	336			
<a href="#">AB211007</a>	319	.....C.....A.C.....	378			
<a href="#">AB196471</a>	300	.....C.....A.C.....	359			
<a href="#">AB196470</a>	300	.....C.....A.C.....	359			
<a href="#">AB196469</a>	300	.....C.....A.C.....	359			
<a href="#">AB196468</a>	300	.....C.....A.C.....	359			
35a1B	62	AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTT	121			
<a href="#">EF675626</a>	380	.....	439			
<a href="#">AB363732</a>	362	.....T.....	421			
<a href="#">EF081295</a>	296	.....T.....	355			
<a href="#">EU072709</a>	327	.....	386			
<a href="#">EF371373</a>	380	.....	439			
<a href="#">AB245379</a>	358	.....T.....	417			
<a href="#">AB211020</a>	377	.....	436			
<a href="#">AB211019</a>	380	.....	439			
<a href="#">AB211017</a>	348	.....	407			
<a href="#">AB211009</a>	353	.....	412			
<a href="#">EU175937</a>	357	.....	416			
<a href="#">EF371374</a>	380	.....A.....	439			

<a href="#">AM423145</a>	355	.....T.....	414
<a href="#">AY536539</a>	304	.....	363
<a href="#">AY536535</a>	305	.....	364
<a href="#">AB211011</a>	337	.....	396
<a href="#">AB211007</a>	379	.....	438
<a href="#">AB196471</a>	360	.....T.....	419
<a href="#">AB196470</a>	360	.....T.....	419
<a href="#">AB196469</a>	360	.....T.....	419
<a href="#">AB196468</a>	360	.....T.....	419
35a1B	122	GTAAGGGAAGAACACGTGCCA-TTTAACTGATGGCACCTTGACGGTACCTTACGAGAAAG	180
<a href="#">EF675626</a>	440	.....A.....-.....G.....	498
<a href="#">AB363732</a>	422	..T.....A..A...-G.....C...T.....A.....	480
<a href="#">EF081295</a>	356	..T.....A..A...-G.....C...T.....A.....	414
<a href="#">EU072709</a>	387	..T.....A.....GAG.....C.....A..C.....	446
<a href="#">EF371373</a>	440	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	498
<a href="#">AB245379</a>	418	..T.....A..AT...-G.....C...T.....A.....	476
<a href="#">AB211020</a>	437	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	495
<a href="#">AB211019</a>	440	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	498
<a href="#">AB211017</a>	408	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	466
<a href="#">AB211009</a>	413	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	471
<a href="#">EU175937</a>	417	.....A.C...G-G.....CC..TG..C.....C.....	475
<a href="#">EF371374</a>	440	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	498
<a href="#">AM423145</a>	415	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	473
<a href="#">AY536539</a>	364	.....A.C...G-G.....CC..TG..C.....C.....	422
<a href="#">AY536535</a>	365	.....A.C...G-G.....CC..TG..C.....C.....	423
<a href="#">AB211011</a>	397	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	455
<a href="#">AB211007</a>	439	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	497
<a href="#">AB196471</a>	420	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	478
<a href="#">AB196470</a>	420	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	478
<a href="#">AB196469</a>	420	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	478
<a href="#">AB196468</a>	420	.....A.C...G-G.....CC...G..C.....C.....	478
35a1B	181	CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT	231
<a href="#">EF675626</a>	499	.....T...TG.....	549
<a href="#">AB363732</a>	481	.....T...TG.....	531
<a href="#">EF081295</a>	415	.....T...TG.....	465
<a href="#">EU072709</a>	447	.....T...TG.....	497
<a href="#">EF371373</a>	499	.....T...TG.....	549
<a href="#">AB245379</a>	477	.....T...TG.....	527
<a href="#">AB211020</a>	496	.....T...TG.....	546
<a href="#">AB211019</a>	499	.....T...TG.....	549
<a href="#">AB211017</a>	467	.....T...TG.....	517
<a href="#">AB211009</a>	472	.....T...TG.....	522
<a href="#">EU175937</a>	476	.....T...TG.....	526
<a href="#">EF371374</a>	499	.....T...TG.....	549
<a href="#">AM423145</a>	474	.....T...TG.....	524
<a href="#">AY536539</a>	423	.....T...TG.....	473
<a href="#">AY536535</a>	424	.....T...TG.....	474
<a href="#">AB211011</a>	456	.....T.....T...TG.....	506
<a href="#">AB211007</a>	498	.....T.....T...TG.....	548
<a href="#">AB196471</a>	479	.....T...TG.....	529
<a href="#">AB196470</a>	479	.....T...TG.....	529
<a href="#">AB196469</a>	479	.....T...TG.....	529
<a href="#">AB196468</a>	479	.....T...TG.....	529



## Primer 531R

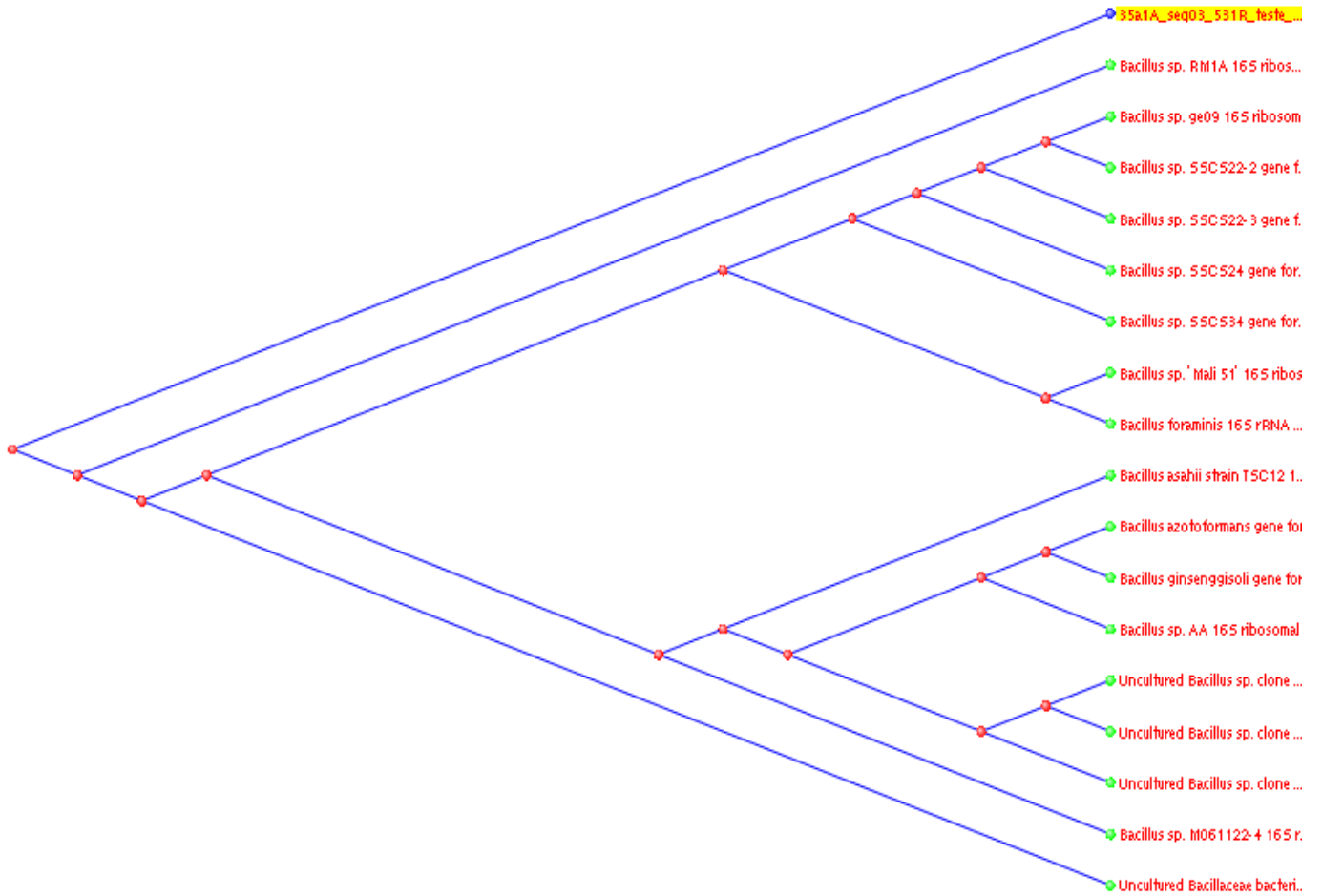
### Amostra 35a1A (semelhante ao anterior)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">EF675626.1</a>	Bacillus sp. RM1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">293</a>	293	100%	1e-78	89%
<a href="#">AB363732.1</a>	Bacillus azotoformans gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15712	<a href="#">266</a>	266	100%	2e-70	86%
<a href="#">EF081295.1</a>	Bacillus sp. AA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">266</a>	266	100%	2e-70	86%
<a href="#">EU072709.1</a>	Bacillus sp. M061122-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">264</a>	264	100%	5e-70	86%
<a href="#">AB245379.1</a>	Bacillus ginsenggisoli gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Gsoil 3045	<a href="#">260</a>	260	100%	7e-69	85%
<a href="#">EF371373.1</a>	Bacillus sp. ge09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">257</a>	257	100%	8e-68	85%
<a href="#">AB211020.1</a>	Bacillus sp. SSCS22-2 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS22-2	<a href="#">257</a>	257	100%	8e-68	85%
<a href="#">AB211019.1</a>	Bacillus sp. SSCS22-3 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS22-3	<a href="#">257</a>	257	100%	8e-68	85%
<a href="#">AB211017.1</a>	Bacillus sp. SSCS24 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS24	<a href="#">257</a>	257	100%	8e-68	85%
<a href="#">AB211009.1</a>	Bacillus sp. SSCS34 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SSCS34	<a href="#">257</a>	257	100%	8e-68	85%
<a href="#">EU249555.1</a>	Bacillus asahii strain TSC12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	85%
<a href="#">EF663416.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-MA3S1_D10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	85%
<a href="#">EF072622.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WA2S2_H12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	85%
<a href="#">EF074721.1</a>	Uncultured Bacillus sp. clone GASP-WC1W2_B04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	85%
<a href="#">EF074427.1</a>	Uncultured Bacillaceae bacterium clone GASP-WC1S1_F08 16S ribosomal RNA	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	84%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	gene, partial sequence					
<a href="#">AY211145.1</a>	Bacillus sp. 'Mali 51' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	85%
<a href="#">AJ717382.1</a>	Bacillus foraminis 16S rRNA gene, type strain CV53T	<a href="#">255</a>	255	100%	3e-67	85%
35a1A	1	ACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGNNNNNNNGNNTAGCCGTGGCTTTCTCENN	60			
<a href="#">EF675626</a>	549	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GC	490			
<a href="#">AB363732</a>	531	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GT	472			
<a href="#">EF081295</a>	465	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GT	406			
<a href="#">EU072709</a>	497	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	438			
<a href="#">AB245379</a>	527	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GT	468			
<a href="#">EF371373</a>	549	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	490			
<a href="#">AB211020</a>	546	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	487			
<a href="#">AB211019</a>	549	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	490			
<a href="#">AB211017</a>	517	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	458			
<a href="#">AB211009</a>	522	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	463			
<a href="#">EU249555</a>	451	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	392			
<a href="#">EF663416</a>	487	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	428			
<a href="#">EF072622</a>	500	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	441			
<a href="#">EF074721</a>	500	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	441			
<a href="#">EF074427</a>	504	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	445			
<a href="#">AY211145</a>	563	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	504			
<a href="#">AJ717382</a>	544	.....CA...A.....CTGGCAC.TA.T.....GGT	485			
35a1A	61	-A-GGTACCGTCAAGGTGCCATC--AGTTAAA-T-GGCACGTGTTCTTCCCTTACNNCNG	114			
<a href="#">EF675626</a>	489	-.A.....G.....--.....T.....AA.A.	435			
<a href="#">AB363732</a>	471	T.-.....A...G.--.....C-..T..T.....A..AA.A.	417			
<a href="#">EF081295</a>	405	T.-.....A...G.--.....C-..T..T.....A..AA.A.	351			
<a href="#">EU072709</a>	437	T.-.....G...G.--.....CTC-..T..T.....A..AA.A.	382			
<a href="#">AB245379</a>	467	T.-.....A...G.--.....C-..AT..T.....A..AA.A.	413			
<a href="#">EF371373</a>	489	-.A.....G..C...GG.--.....C-C-..G.T.....AA.A.	435			
<a href="#">AB211020</a>	486	-.A.....G..C...GG.--.....C-C-..G.T.....AA.A.	432			
<a href="#">AB211019</a>	489	-.A.....G..C...GG.--.....C-C-..G.T.....AA.A.	435			
<a href="#">AB211017</a>	457	-.A.....G..C...GG.--.....C-C-..G.T.....AA.A.	403			
<a href="#">AB211009</a>	462	-.A.....G..C...GG.--.....C-C-..G.T.....AA.A.	408			
<a href="#">EU249555</a>	391	C.-.....A...G.--.....CTC-..T..T.....G..AA.A.	336			
<a href="#">EF663416</a>	427	T.-.....A...G.--.....CTC-..T..T.....A..AA.A.	372			
<a href="#">EF072622</a>	440	T.-.....A...G.--.....CTC-..T..T.....A..AA.A.	385			
<a href="#">EF074721</a>	440	T.-.....A...G.--.....CTC-..T..T.....A..AA.A.	385			
<a href="#">EF074427</a>	444	C.-.....G.CT.T.CG.-.-.....T.....G..AA.A.	388			
<a href="#">AY211145</a>	503	C.-.....GG.--.....CT-CC.....T.....G..AA.A.	448			
<a href="#">AJ717382</a>	484	C.-.....GG.--.....CT-CC.....T.....G..AA.A.	429			
35a1A	115	AGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCTTCGCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTT-NTCC	173			
<a href="#">EF675626</a>	434	.....CG... 375				
<a href="#">AB363732</a>	416	.....A.....CG... 357				
<a href="#">EF081295</a>	350	.....A.....CG... 291				
<a href="#">EU072709</a>	381	.....CG... 322				
<a href="#">AB245379</a>	412	.....A.....CG... 353				
<a href="#">EF371373</a>	434	.....CG... 375				
<a href="#">AB211020</a>	431	.....CG... 372				
<a href="#">AB211019</a>	434	.....CG... 375				
<a href="#">AB211017</a>	402	.....CG... 343				
<a href="#">AB211009</a>	407	.....CG... 348				
<a href="#">EU249555</a>	335	.....CG... 276				
<a href="#">EF663416</a>	371	.....CG... 312				
<a href="#">EF072622</a>	384	.....CG... 325				
<a href="#">EF074721</a>	384	.....CG... 325				
<a href="#">EF074427</a>	387	.....-CGT. 329				
<a href="#">AY211145</a>	447	.....CG... 388				
<a href="#">AJ717382</a>	428	.....CG... 369				
35a1A	174	ATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC	203			
<a href="#">EF675626</a>	374	..... 345				
<a href="#">AB363732</a>	356	..... 327				
<a href="#">EF081295</a>	290	..... 261				
<a href="#">EU072709</a>	321	..... 292				
<a href="#">AB245379</a>	352	..... 323				
<a href="#">EF371373</a>	374	..... 345				
<a href="#">AB211020</a>	371	..... 342				



<a href="#">AB211019</a>	374	.....	345
<a href="#">AB211017</a>	342	.....	313
<a href="#">AB211009</a>	347	.....	318
<a href="#">EU249555</a>	275	.....	246
<a href="#">EF663416</a>	311	.....	282
<a href="#">EF072622</a>	324	.....	295
<a href="#">EF074721</a>	324	.....	295
<a href="#">EF074427</a>	328	.....	299
<a href="#">AY211145</a>	387	.....	358
<a href="#">AJ717382</a>	368	.....	339



Anexo 02 – Sequência completa do gene *rpoB* mostrando os nucleotídeos divergentes.

```

1  acgtgaaatc actggtcctg gcttgaaaga agctaaagag cttggtgaca acactccaaa
61  accacttaaa gaaggtattg ctaaagaaga agctgaagag cttaaagcta aacttgaaga
121 agttggcgct tctgtagaag ttaagtaatc ttcaacttacc tgtaggggaa gctcgcctttt
181 atgaggcgag ctttttcttt gccattcttt aagccatgaa aaaaggaggt tctaataatg
241 agtgagcact attattcaga aaaaccttca gtaaaaagca acaagcaaac ctgggtctttt
301 aggcttcgga ataaagattt cacgtttacc agcgacagcg gggttttttc taaaaagaa
361 gttgatttcg gctcccgcct gctgattgat tcttttgaag agcctgaggt tgagggcggc
421 attttagatg taggctgcgg atacggcccg attggtttat cgctcgccag cgactttaa
481 gaccggacca tccacatgat tgacgttaat gagagagccg tagaactatc aaatgaaat
541 gcggaacaga acggaataac aaacgttaag atttatcaa gcgatttgtt ttcaaactgtt
601 gattctgctc aaacatttgc ttctattctt acaaatcccc caatccgagc cggaaaaaaa
661 gttgtccatg ctatctttga gaaaagcgct gaacacttaa aagcttcagg tgaattgtgg
721 atcgtcatic agaaaaagca aggcgcgcct tctgccattg aaaagctcga ggaactgttc
781 gatgaagttt ccgctcgttca aaaaaagaaa ggctattata tcataaaagc aaaaaagtt
841 tgactcggta ttttaactat gttaatattg taaaatgcca atgtatata tttgcttgat
901 atgatgaatt gtcaatatct atgtataaat tatacaagta tggaaatgct aataaaatcg
961 gtatttgttt ttggatgtgg ttttcttaat tagaaacctt tttttctttt gtctgttaa
1021 agtattttct tcttttgaa gaaatgctta ttacacatat aatcgcagct atttgagggg
1081 tgaatcagtt gacaggctca atagttcagt atggacgaca ccgcccagcg agaagctatg
1141 ctgcgattag cgaagtgtta gaattaccaa atctcattga aattcaaacc tcttcttacc
1201 agtggtttct tgatgagggg cttagagaga tgtttcaaga catatcacca attgaggtat
1261 tcaactgtaa cctctctctt gagttcattg attatagttt aggtgagcct aaatctcctg
1321 tgagggaaatc aaaagaactc gatgtgactt actcagctcc gctaagagtg aaggtctggt
1381 taattaacaa agaaactgga gaggtaaaag accaagatgt cttcatgggt gatttcccta
1441 ttatgacaga tacaggtaact tttatcatta acggtgcgga acgtgttacc gtttccagc
1501 ttggtcggtc tccaagtgtt tatttcagtg gtaaaagtag caaaaacggt aaaaaaggtt
1561 ttaccgcaac tgtcattcca aaccgtggcg catgggttag atacgaaact gatgcgaaag
1621 atggtgttta tgtccgcatt gatcgcacac gtaagttgcc ggttacggtt cttttgcgtg
1681 ctctcggcct cggctccgat caagagatc ttgatctcat agggaaaaac gaatacctcg
1741 gaaatcagct tgataaagat aacacagaaa acagcgacaa agcgttgctg gaaatttacg
1801 agcgtctccg tccctggagag ccgctacag tagaaaatgc gaaaagcttg cttgatctc
1861 gtttctttga tccgaaacga tacgatcttg ccaatgtagg acgctataaa attaataaaa
1921 aactcctat taagaatcgc ctcttcaatc agagacttgc tgaaacgctt gttgatcctg
1981 aaacaggaga aatccttgct gaaaaaggcc agattcttga tagaagaacg cttgataaag
2041 tactgcaaat cttagaaaac ggaatcgggt ttagaagctt gtatccgaat ggcggcgctg
2101 ttgaagatga agtgactctt caatcaatta aaatctttgc tccgactgat caagaaggag
2161 aacaggttat caatgtaatc ggcaatgctt acatcgaaga agagattaaa aacatcacgc
2221 ctgctgatat tatttcttca atcagctact tcttcaacct gctgcacgga gtaggcgaca
2281 cagatgatat cगतatctt gaaacccgct gtttactgtt tgtagcgag cttctcaga
2341 accaattccg tatcggttta agccgtatgg agcgtgtggt tctgtgagaga atgtcaattc
2401 aagatacгаа tacaattacg cctcagcagc tgatcaatat tctgctcgtt attgctcca
2461 ttaaagagtt ctttggaagc tcacagcttt ctcaattcat ggtacagagc aaccgcttg
2521 ctgaattaac gcacaagcgt gctctgtcag cattaggacc gggcggtatg acacgtgagc
2581 gtgccggaat ggaagtgcgt gacgttccact actcccacta tggccgtatg tgtccgattg
2641 aaacgctcga gggcccgaac atcggtttga tcaactcact atcatcttat gcaaaagtaa
2701 accgttttgg ctttattgaa acgccatctc gccgcttga cctgaaaca gggaaagtaa
2761 cggcgagaat cgattactta actcgtgatg aagaggataa ctatgttgtc gctcaagcga
2821 atgctcgtct tgatgacgaa ggcgccttta ttgatgacag catcgtagct cgtttccgcg
2881 gggagaacac cgttgtttcc agaaatcgtg tagactacat ggatgatcgc cctaagcagg
2941 ttgtatctgc tgcgacagca tgtatcccgt tcttagaaaa cgatgactcc aaccgtgccc
3001 tcatggagac gaacatgcag cgtcggctg tgcccttgat gcagccggaa gcgcctttg
3061 ttggaactgg tatggaatac gtatcaggaa aagactctgg tgcgcgtggt atttgtaaac
3121 accctggtat cgttgaacgc gtagaagcca aaaacgttt ggttcgccgt tatgaagaag
3181 tagacggtca aaaaagtaaaa ggaaacctgg ataaatacag cctgctgaaa tttgtccgct
3241 ctaaccaagg tacgtgctac aaccagcgtc cgatcgttag tgtcggcgat gaagtggtaa
3301 aaggagaaat ccttgctgac aactccttca tggagcttgg tgaacttgc cttggccgta
3361 acgtaatggt cggcttcatg acgtgggatg gctacaacta tgaggatgcc atcatcatga
3421 gtgaacgcct agtgaaggat gatgtttata catctatcca cattgaagaa tacgaatcag
3481 aagcacgtga tacgaaactt ggacctgaag aatcactcgc cgatattcca aacgtcggg
3541 aagatcgctc tcgcaatctt gatgaccgcg gaatcatccg tattggggca gaagttaaag
3601 acggagatct tcttgttgg aaagtaacgc ctaaaggcgt aactgaaact actgccgaag
3661 aacgccttct tcacgccatc tttggcgaga aagcccgcga ggttcctgat acttctctc
3721 ggtgocctca tggcggcggc ggaattatcc atgacgttaa agtcttcaac cgtgaagacg
3781 tgacgaaact tccctccagt gtaaccagt tagtacgct atatatcgtt cagaaaacgta
3841 agatttctga aggggataaa atggccggtc gtcacggtaa caaaggtgtt atctctaaga
3901 ttcttctcga agaggatatg ccttaccttc ctgacggcac accaattgat atcatgctta
3961 acccgctggg cgtaccatca cgtatgaaca tccggcaggt attggaactt cacatgggta
4021 tggcgcctcg ttacccttgg attcacattg catctcctgt atttgacgga gcgcgagaag
4081 aggatgtctg ggaaacactt gaagaagccg gcatgtctcg tgacgccaaa acagtgcctt
4141 acgacggagc tactggagag ccgtttgata accgtgtatc tgtcggatc atgtacatga
4201 tcaaacctgc tcacatggtt gacgataaac ttcatgcag ctctacagc ccttactcac
4261 ttgttacgca gcagcctctt gcgggtaaag cgcaatttgg cggacacggg tttgggtgaga
4321 tggaggtttg ggcacttgaa gcttacgggt cggcttacac tcttcaagaa attctgactg
4381 ttaagtctga tgacgtggtt ggacgtgtga aaacatacga agccatcgtt aaaggcgaca

```

4441 atgttctcga accagggtgtt ccggaatcat tcaaagtatt aatcaaagaa cttcaaagct  
 4501 taggtatgga tgtcaaaatc ctttctgggtg atgaagaaga aatagaaatg agagatttag  
 4561 aagacgaaga agatgcgaaa caagctgacg gcctggcatt atcaggtgat gaagagccgg  
 4621 aagaacacgc atctgcagac gttgaacgcg atgtagtaac aaaagaataa tctctagtta  
 4681 taaaggcaag tgacatcggg taatccgaag ataaaaaggg aggtaggccc cttgctagat  
 4741 gtgaacaatt ttgagtatat gaacatcggg cttgcttcac cagataaaat ccgttcatgg  
 4801 tcttttgggtg aagtgaaaaa gcctgaaaacg ataaactatc gtacgttaaa acctgaaaag  
 4861 gacggctctat tctgcgaacg cattttcggg ccgactaagg actggggaatg tcattgcggg  
 4921 aagtacaagc gagttcgtta taaaggcgta gtttgtgacc gctgcccagg cgaagtaaca  
 4981 cgggctaaag tccgtcgtga gagaatgggg cacattgaac tggctgcccc agtttcccac  
 5041 atttgggtatt tcaaagggtat tccaagccgt atgggtcttg tgctggatat gtcacctcgt  
 5101 gcttttagaag aagtcattta ctttgcctct tacggtgtaa ctgatccggc gaatacaccg  
 5161 cttgaaaaga aacagcttct gctcgagaaa gaataccgtg cttatcttga taaatacggg  
 5221 aataaattcc aagcatctat ggggtgctgaa gcaattcata aacttcttca agatctcgat  
 5281 cttgtaaaag aagttgatat gttaaaagaa gagctgaaaa cttcacaagg acaacgccgt  
 5341 actcgtgcga tcaaacgtct tgaagtttta gaagccttcc gtaactcagg aaacaagcct  
 5401 tcttggatga tccttgatgt gcttctggtt attcctccgg agcttagacc gatgggtcag  
 5461 ctgatgggag gacgttttgc gacttctgat ttgaatgacc tttatcgtcg tgtcatcaac  
 5521 cgtaacaatc gtttgaacg ctttttgac cttgggtcgc ctacatcat cgttcaaac  
 5581 gaaaagcgta tgcttcaaga ggctgctgat gccctaattg acaacggccg ccgcggaagc  
 5641 cctgtaacag gtctggaaa cagaccgtta aaatctctt ctacatgct gaaagggag  
 5701 caaggccggt tccgtcaaaa ccttcttggg aaacgtgctg attactccgg acgttctgta  
 5761 atcgttggtg gtcctcattt gaaaatgtac caatgcccgt taccgaagga aatggcactt  
 5821 gaacttttca aacctttcgt tatgaaagaa cttgttgaaa aaggctctgc tcacaacatt  
 5881 aagagtgcga aacgcaaaat tgagcgcgta cagcctgaag tttgggatgt actagaatca  
 5941 gttattaagg agcatccggg actgctgaac cgtgccctca cacttcacag attaggtatc  
 6001 caggcgtttg aaccaacgct tggtgaagga cgcgcaatcc gtcttcacc gctcgtatgt  
 6061 acagcttaca acgctgactt tgacgggtgac caaatggcgg ttcacgtacc attatctgct  
 6121 gaagcacaag